

Aus der Indikationsgruppe Herz-Kreislauf-Erkrankungen
der Aventis Pharma Deutschland GmbH

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Effekte einer chronischen Behandlung mit dem
ACE-NEP-Inhibitor AVE 7688 und Ramipril
auf die endotheliale Dysfunktion am Modell des
atherogen gefütterten Kaninchens**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Nadine Weckler

Gießen 2002

Aus der Indikationsgruppe Herz-Kreislauf-Erkrankungen
der Aventis Pharma Deutschland GmbH

Betreuer: PD Dr. W. Linz

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Im Fachbereich vertreten durch: Prof. E. Petzinger

**Effekte einer chronischen Behandlung mit dem
ACE-NEP-Inhibitor AVE 7688 und Ramipril auf
die endotheliale Dysfunktion am Modell des
atherogen gefütterten Kaninchens**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Nadine Weckler

Tierärztin aus Frankfurt

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

1. Berichterstatter: PD Dr. Wolfgang Linz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Petzinger

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2002

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
<i>I.1</i>	<i>Allgemein</i>	<i>1</i>
<i>I.2</i>	<i>Definition der Atherosklerose</i>	<i>2</i>
<i>I.3</i>	<i>Klassifikation der Atherosklerose</i>	<i>2</i>
<i>I.4</i>	<i>Atherogenese</i>	<i>4</i>
<i>I.5</i>	<i>Endotheliale Dysfunktion</i>	<i>6</i>
<i>I.6</i>	<i>Renin-Angiotensin-System (RAS)</i>	<i>8</i>
<i>I.7</i>	<i>ACE und Angiotensin II in atherosklerotischen Plaques</i>	<i>9</i>
<i>I.8</i>	<i>ACE-Inhibitoren</i>	<i>11</i>
<i>I.9</i>	<i>ACE-NEP-Inhibitoren</i>	<i>14</i>
<i>I.10</i>	<i>Tiermodell</i>	<i>17</i>
<i>I.11</i>	<i>Fragestellung</i>	<i>20</i>
II	Material und Methoden	22
<i>II.1</i>	<i>Versuchstiere und Fütterungsprotokoll</i>	<i>22</i>
<i>II.1.1</i>	<i>Versuchstiere</i>	<i>22</i>
<i>II.1.2</i>	<i>Tierhaltung</i>	<i>22</i>
<i>II.1.3</i>	<i>Tierfütterung</i>	<i>22</i>
<i>II.2</i>	<i>Studiendesign</i>	<i>24</i>
<i>II.3</i>	<i>Verwendete Substanzen</i>	<i>26</i>
<i>II.3.1</i>	<i>Ramipril</i>	<i>26</i>
<i>II.3.2</i>	<i>ACE-NEP-Inhibitor AVE 7688</i>	<i>28</i>
<i>II.4</i>	<i>Blutentnahme</i>	<i>29</i>
<i>II.5</i>	<i>Messung von Blutdruck und Herzfrequenz</i>	<i>30</i>
<i>II.6</i>	<i>Sektion</i>	<i>33</i>
<i>II.7</i>	<i>Funktionelle Untersuchungen der isolierten Aorten</i>	<i>33</i>
<i>II.7.1</i>	<i>Substanzen und Lösungen</i>	<i>33</i>
<i>II.7.2</i>	<i>Versuchsapparatur</i>	<i>34</i>
<i>II.7.3</i>	<i>Präparation der Aorta</i>	<i>36</i>

Inhaltsverzeichnis

II.7.4	Versuchsprotokoll	37
II.8	Plauefärbung	38
II.8.1	Aortenfärbung mit Ölrot	38
II.8.2	Bestimmung der Plauegröße	39
II.9	Bestimmung von Lipidparametern und ACE-Aktivität	39
II.9.1	Cholesterinbestimmung	39
II.9.2	HDL-Cholesterinbestimmung	40
II.9.3	LDL-Cholesterinbestimmung	41
II.9.4	Triglyceridbestimmung	41
II.9.5	ACE-Aktivitätsbestimmung	42
II.10	Bestimmung von Endothelin und von-Willebrand-Faktor	42
II.10.1	Big-Endothelinbestimmung	42
II.10.2	Von-Willebrand -Faktor-Bestimmung	43
II.11	Nachweis der NO/O ₂ ⁻ - Freisetzung	43
II.12	Statistik	44
III	Ergebnisse	46
III.1	Ergebnisse der Blutdruck- und Herzfrequenzmessung	46
III.1.1	Basale Blutdruckwerte und Herzfrequenzen	46
III.1.2	Blutdruckwerte nach Angiotensin I- und Bradykinin-Gabe	48
III.2	Ergebnisse der Messung der isolierten Aorten	51
III.2.1	Ergebnisse der Aortenkontraktionen	51
III.2.2	Ergebnisse der Aortenrelaxationen	54
III.3	Nachweis der Stickstoffmonoxidfreisetzung	59
III.4	Nachweis der Superoxidfreisetzung	60
III.5	Planimetrisch ermittelte Plaques im Aortenbogen	61
III.6	Ergebnisse der Bestimmung von Lipidparametern	64
III.6.1	Ergebnisse der 1. Messung (6 Wochen)	64
III.6.2	Ergebnisse der 2. Messung (18 Wochen)	67
III.7	Ergebnisse der Bestimmung des Big-Endothelins	70

Inhaltsverzeichnis

III.8	<i>Ergebnisse der Bestimmung des von-Willebrand-Faktors</i>	71
III.9	<i>Nachweis der ACE-Aktivität</i>	72
III.10	<i>Organgewichte</i>	73
IV	Diskussion	74
IV.1	<i>Der Einfluß von ACE- und ACE-NEP-Hemmung auf das vaskuläre System</i>	74
IV.2	<i>Ergebnisse weiterer Untersuchungen</i>	84
IV.3	<i>Abschliessende Betrachtung</i>	86
V	Zusammenfassung	89
VI	Summary	91
VII	Literaturverzeichnis	93
VIII	Danksagung	109

Abkürzungen

Abkürzungen

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
Bk	Bradykinin
BNP	„brain“ natriuretisches Peptid
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CNP	C-Typ natriuretische Peptid
CO ₂	Kohlendioxid
d	day/ Tag
EDRF	„Endothelium derived relaxing factor“
eNOS	endothelial nitric oxide synthase/ endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
et al.	„et alii“
fmol	Femtomol (10 ⁻¹⁵ Mol)

Abkürzungen

g	Gramm
GTR	Guanosintriphosphat
HDL	„High Density Lipoprotein“
Hg	Quecksilber
HR	heart rate/ Herzfrequenz
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
LDL	„low density lipoprotein“
M.	Musculus
max.	maximal
mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)
min	Minute
mL	Milliliter (10^{-3} Liter)
mm	Millimeter (10^{-3} Meter)
mmol	Millimol (10^{-3} Mol)
mol	molar
ms	Millisekunde (10^{-3} Sekunde)
mRNA	messenger ribonucleic acid/ Boten-Ribonucleinsäure
mU	Milliunit (10^{-3} Unit)
μg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
μmol	Mikromol (10^{-6} Mol)

Abkürzungen

n	Anzahl
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)
NEP	neutrale Endopeptidase
nmol	Nanomol (10^{-9} Mol)
NO	nitric oxide/ Stickstoffmonoxid
NOS	nitric oxide synthase/ Stickstoffmonoxidsynthase
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Oxygenium / Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanionradikal
ox.	oxidiert
pH	potentia hydrogenii / „Stärke des Wasserstoffs“ (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
Phe	Phenylephrin
pmol	Picomol (10^{-12} Mol)
RAS	Renin-Angiotensin-System
SEM	standard error of the mean/ mittlere Standardabweichung
sGC	soluble guanylate cyclase/ lösliche Guanylatzyklase
SNP	Natriumnitroprussid
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
U	unit
u.a.	unter anderem
VLDL	„very low density lipoprotein“
vs.	versus/gegen

Abkürzungen

vWF	von-Willebrand-Faktor
WHHL	„Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit“
WHO	World Health Organization/ Weltgesundheitsorganisation
Wo.	Woche
\bar{x}	Mittelwert
z.B.	zum Beispiel

I Einleitung

I.1 Allgemein

Die Atherosklerose ist mit ihren fatalen Endpunkten wie Myokard- und Zerebralinfarkt die führende Todesursache in der westlichen Welt (Ross, 1993).

In Deutschland leiden zur Zeit etwa 10 Mio. Menschen an einer nachgewiesenen atherosklerotischen Gefäßerkrankung, doch nur ein Drittel dieser Patienten hat klinische Symptome (Bundesamt für Statistik, 1999). Werden die Menschen nicht ganz gezielt daraufhin untersucht, bleibt die Erkrankung meist lange Zeit unbemerkt. Risikofaktoren für Atherosklerose sind Hypercholesterinämie, Rauchen, Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, Alter, genetische Veranlagung sowie das männliche Geschlecht. Eine Störung der Endothelfunktion bei solchen Patienten ist häufiger mit Herz-Kreislauserkrankungen, wie Herzinfarkt oder Schlaganfall, korreliert als bei Patienten mit denselben Risikofaktoren, aber intaktem Endothel (Schachinger & Zeiher, 2000).

Lange Zeit war man der Annahme, dass Atherosklerose nach und nach zu einer Einengung des Gefäßlumens, mit zunehmender Ischämie und letztendlich zum Infarkt führe.

Heute weiß man jedoch, dass sich innerhalb kürzester Zeit aus einer völlig asymptomatischen Atherosklerose, die sich in einer stabilen Angina pectoris äußert, eine lebensbedrohliche Situation entwickeln kann.

I.2 Definition der Atherosklerose

Die WHO definierte 1958 den Begriff „Atherosklerose“ als eine variable Kombination von Intimaveränderungen mit fokaler Akkumulation von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutprodukten, fibrösem Gewebe und Kalziumablagerungen mit Veränderungen der Media in großen und mittleren elastischen und muskulären Arterien (World Health Organization Technical Report Series, 1958). Die Atherosklerose ist jedoch zusätzlich das Ergebnis eines komplexen Wechselspiels zwischen Blutbestandteilen, veränderten Flußbedingungen und Gefäßwandabnormitäten.

Sie ist sicherlich nicht einfach nur eine unvermeidliche degenerative Konsequenz des Alters, sondern vielmehr ein chronisch entzündlich aktivierter Zustand des Gefäßsystems. Durch die Ruptur einer vulnerablen Plaque mit nachfolgender Thrombose kann dieser Prozeß in ein akut klinisches Ereignis umschlagen (Lusis, 2000).

I.3 Klassifikation der Atherosklerose

Die WHO schlägt für die Atherosklerose folgende Terminologie vor (World Health Organization Technical Report Series, 1958) :

- „fatty streak“ (erste sichtbare, oberflächliche Flecken),
- „fibröse Plaque“ (umschriebene, erhabene feste und grau-weiße Intimaverdickung),
- „Atherom“ (atherosklerotische Plaque mit prädominanter „fettiger“ Erweichung)
- „komplizierte Läsion“ (Läsion mit zusätzlichen Veränderungen wie Blutung, Thrombose, Ulzeration und Verkalkung)

Diese Klassifikation bezieht sich jedoch hauptsächlich auf makroskopische Kriterien.

1994 wurde deshalb von der American Heart Association eine neue differenziertere Terminologie eingeführt (siehe Tabelle 1).

<i>Läsionstyp</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Komposition</i>
I	Initiale Läsion	Initiale Lipoproteine und vermehrte Makrophagen
II	„Fatty streak“	Typ I + Makrophagenakkumulation/ intrazelluläre Lipide
III	Präatherom	Typ II + extrazelluläre Lipidpools
IV	Atherom	Typ III + konfluierende extrazelluläre Lipidpools (Atheromkern) + strukturelle Intimaschäden
V	Fibroatherom	Typ IV + fibröse Kappe + Nekrose
VI	Thrombo-Hämorrhagische Läsion	Typ V + thrombotisches Material und/ oder Einblutung und/ oder Erosion oder Fissur
VII	Kalzifizierte Läsion	Jede fortgeschrittene Läsion, die vorwiegend aus kalzifizierten Arealen besteht
VIII	Fibrotische Läsion	Jede fortgeschrittene Läsion, die vorwiegend aus Kollagen besteht

Tab. 1 : Atherosklerotische Plaquetypen nach Klassifikation der American Heart Association (1994) bzw. Stary (1992)

I.4 Atherogenese

Das Initialstadium der atherosklerotischen Gefäßveränderungen sind subendotheliale Lipideinlagerungen, die sog. „fatty streaks“. Solche Bereiche finden sich im Menschen bereits schon im Kindesalter (Stary, 1989). Diese Läsionen sind klinisch zwar nicht relevant, aber sie sind die Vorboten der fortgeschrittenen Läsionen, welche charakterisiert sind durch einen lipidreichen Kern mit einer zum Lumen hin abgrenzenden fibrösen Kappe. Von solchen atherosklerotischen Plaques gehen verschiedene Risiken für den Patienten aus. Zum einen kann der Plaque durch seine zunehmende Größe das Lumen des Gefäßes einengen, was zu einer Unterversorgung des Gewebes führt. Eine andere, weitaus größere Gefahr ist die plötzliche Plaqueruptur, mit den oben genannten Folgen des Myokard- und Zerebralinfarkts.

Präferenzielle Manifestations- und Komplikationsorte sind die Arterien von Herz, Hirn und Extremitäten. Besonders betroffen sind die Bifurcationen bzw. die Abgänge dieser Gefäße, was Wirbelbildungen und Beanspruchungen durch Zug- und Scherkräfte zugrunde liegt.

Wichtigster bekannter Risikofaktor der Atheroskleroseentstehung ist die Hyperlipidämie, hauptsächlich eine Erhöhung der low-density-lipoprotein-Fraktion (LDL). Dies sind die Lipoproteine, die den Hauptanteil des Cholesterins im Blut transportieren.

Endothelzellen verfügen an ihrer Oberfläche über Rezeptoren für LDL-Partikel (Steinberg, 1983). Diese akkumulieren bei Hyperlipidämie an der Gefäßwand. Im Hinblick auf die Atherogenese ist die Fähigkeit der Endothelzellen, LDL oxidativ zu modifizieren, hervorzuheben. Das oxidierte LDL wird von Makrophagen aufgenommen

und diese wandeln sich in ortsständige Schaumzellen, den charakteristischen Zellen der atheromatösen Frühläsion, um (Brown & Goldstein, 1983; Dresel, 1989).

Zahlreiche Untersuchungen in Tiermodellen und am Menschen führten Ross zu der Formulierung der sog. Response-to-injury-Theorie, bei der nach initialer Verletzung bzw. Denudation des Endothels die proliferative Reaktion der Gefäßwand als zentraler Mechanismus angesehen wird (Ross, 1986 + 1993).

Der weitere Prozess der Entstehung einer Plaque beinhaltet verschiedene pathologische Vorgänge. 1. Akkumulation von Entzündungszellen wie Makrophagen mit erhöhter Permeabilität des Endothels (Faruqi & DiCorleto, 1993; Hansson, 1993); 2. Aktivierung und Proliferation von glatten Muskelzellen (Rekhter & Gordon, 1994; Thyberg et al., 1990); 3. Degeneration mit Lipidakkumulation (Steinberg et al., 1989; Ylä-Herttuala, 1991); 4. Nekrose, wahrscheinlich in erster Linie durch zytotoxische Effekte oxidierten Lipide bzw. Lipoproteine (Witztum, 1994); 5. Kalzifikation bzw. Verknöcherung (Demer et al., 1994); 6. Gerinnungsvorgänge mit Plättchenaktivierung und Fibrinpräzipitation (Falk & Fernandez-Ortiz, 1995; Fuster et al., 1992). Als Ursache für die primäre Denudation bzw. Dysfunktion des Endothels werden verschiedene Faktoren, wie Blutflußänderungen z.B. bei Bluthochdruck, chemische Veränderungen z.B. durch oxidiertes LDL, Toxine oder Viren diskutiert.

Sicher ist jedoch, dass dem Endothel bei der Pathogenese der Atherosklerose eine ganz besondere Rolle zukommt.

I.5 Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel, welches das gesamte vaskuläre System sowie den Herzinnenraum auskleidet und somit die Grenze zwischen Blut und Gefäßwand bildet. Es wurde lange Zeit nur als einfache semipermeable Membran betrachtet. Seit 1980 Furchgott und Zawadzki bewiesen haben, dass aus dem Endothel Mediatoren mit vasodilatierenden Funktionen freigesetzt werden, hat die Forschung auf diesem Gebiet weitere große Fortschritte gemacht.

Heute weiß man, dass das Endothel das größte endokrine Organ ist, welches verantwortlich ist für viele regulatorische und anti-atherosklerotische Funktionen.

Die wichtigsten Aufgaben des Endothels sind : 1. Aufrechterhalten der Diffusionsbarriere zwischen Gefäßwand und Blut sowie Kontrolle der durch die Gefäßwand tretenden Moleküle, 2. Bildung einer antithrombotisierenden Oberfläche, 3. Metabolisierung vasoaktiver Stoffe und Regulation des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur, 4. Bildung von Wachstumsfaktoren und von Polypeptiden, die eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung spielen, 5. Stabilisierung der Homöostase (Ross, 1992).

Im gesunden Zustand zeichnet sich das Endothel durch anti-atherosklerotische und antithrombotische Funktionen aus.

Es werden die Plättchenaggregation, Monozytenadhäsion, Proliferation von glatten Muskelzellen und die Koagulation gehemmt.

Im Gegensatz dazu zeichnet sich ein dysfunktionelles Endothel durch Adhäsion von Thrombo- und Leukozyten, ein vermehrtes Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen und einer gesteigerten Makrophagen-

aktivität aus. Die zahlreichen Makrophagen nehmen oxidiertes Cholesterol auf und werden so zu den gefürchteten Schaumzellen, den sog. „fatty streaks“, den ersten sichtbaren atherosklerotischen Läsionen.

Zu den bedeutendsten molekularen Mediatoren der Gefäßprotektion gehören u. a. Bradykinin und Stickstoffmonoxid (NO), welche diese Reaktionen des dysfunktionellen Endothels wiederum hemmen.

Einer der wichtigsten Vorgänge hierbei ist die Bildung von NO. NO wird in Endothelzellen kontinuierlich aus der Aminosäure L-Arginin durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet. Die Aminosäure L-Arginin wird unter Sauerstoffeinwirkung mittels NADPH zu L-Citrullin oxidiert. Dabei kommt es zur Freisetzung von NO, welches über die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) erhöht und zu einer Relaxation der Gefäßmuskulatur mit einhergehender Blutdrucksenkung führt (Laufs et al., 1998). Weiterhin hemmt es die Plättchenaggregation und –adhäsion (Radomski et al., 1991) und die Proliferation von glatten Muskelzellen (Mooradian et al., 1995). Eine Reihe von Krankheiten, wie Atherosklerose und Hypercholesterinämie, können diesen fein abgestimmten Mechanismus der NO-Synthese und damit den Effekt von NO auf die Modulation des Gefäßtonus beeinträchtigen. Bei einer endothelialen Dysfunktion ist die Produktion von NO vermindert und damit auch dessen protektiver Effekt.

Studien haben gezeigt, dass eine reduzierte Verfügbarkeit an NO (durch Hemmung der NO-Synthase) eine neointimale Proliferation fördert (Cayatte et al., 1994) und eine erhöhte Verfügbarkeit an NO

(durch Gabe des Substrates L-Arginin) diese Entwicklung hemmt (Hamon et al., 1994).

Eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit geht mit einer erhöhten Superoxidbildung (O_2^-) einher (Wiemer et al., 2001). Ursache hierfür ist eine dysfunktionelle eNOS, die anstatt NO Superoxid bildet. Hierdurch kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen NO und O_2^- . Die zugrunde liegenden Mechanismen beruhen auf der Abwesenheit des Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH4) oder des Substrates L-Arginin (Stroes et al., 1998; Kerr et al., 1999).

Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig die Rolle eines funktionellen Endothels in der Verhinderung bzw. Förderung der Atherosklerose ist.

I.6 Renin-Angiotensin-System (RAS)

Das Renin-Angiotensin-System ist mit seinem wichtigsten Effektorpeptid Angiotensin II (Ang II) als potenter Modulator von Blutdruck und Volumenhomöostase bekannt. Aufgrund dieser Wirkung wurde dem RAS schon frühzeitig eine pathophysiologische Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen zugeschrieben.

Die Ang II - Biosynthese startet mit der Abspaltung von Angiotensin I (Ang I) aus Angiotensinogen durch Renin. Das biologisch inaktive Ang I wird unter dem Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) durch Abspaltung der beiden endständigen Aminosäuren in Ang II umgewandelt.

Proteinkomponenten des RAS findet man in den verschiedenen Schichten der arteriellen Gefäßwand vor. Angiotensinogen und Renin

wurden in der Adventitia, Media und im Endothel entdeckt (Eggena et al., 1990; Naftilan et al., 1991).

ACE hingegen findet sich hauptsächlich im Endothel und zu einem geringen Teil in der Adventitia (Rogerson et al., 1992; Wilson et al., 1987).

Dzau et al. zeigten, dass es zwei Renin-Angiotensin-Systeme gibt. Zum einen das zirkulierende RAS und zum anderen das gewebeständige oder lokale RAS (Dzau et al., 1984 + 1988).

Dem zirkulierenden RAS werden Akut- bzw. Kurzzeiteffekte der kardiovaskulären/ renalen Homöostase zugeordnet, wie etwa Vasokonstriktion oder Blutdruckerhöhung.

Auf das gewebeständige RAS bezieht man Langzeiteffekte, wie Gefäß- und Herzhypertrophie und Proliferation von glatten Muskelzellen (Geisterfer et al. 1988; Griffin et al., 1991).

Bei der Verteilung des ACE im Organismus geht man davon aus, dass weniger als ein Drittel zirkuliert. Der größte Anteil findet sich lokal im Gewebe (Dzau et al., 1993).

I.7 ACE und Angiotensin II in atherosklerotischen Plaques

Über die Stimulation der Subtyp AT_1 -Rezeptoren wirkt Ang II auf die Regulation des Gefäßtonus und des Blutflusses. Es ist einer der stärksten bekannten endogenen Vasokonstriktoren und kann zusätzlich an der Entstehung von Gefäßhypertrophie oder der Gefäßreaktion nach Entzündung oder Verletzung beteiligt sein (Dzau, 1988). So findet man in Regionen mit Plaque vermehrt gewebeständiges ACE, welches Ang II verstärkt fokal bildet. Diet et

al. zeigte dies in humanen Koronararterien (Diet et al., 1996). Er fand im Endothel von fortgeschrittenen Läsionen, vergesellschaftet mit inflammatorischen Zellen wie lipidbeladenen Makrophagen und T-Lymphozyten, eine deutlich verstärkte Akkumulation von Gewebe-ACE, woraus sich eine erhöhte Synthese von lokalem Ang II ergibt.

Auch direkt in Makrophagen aus Atheroektomieproben konnte vermehrt Ang II isoliert werden (Potter et al., 1998).

Gleiche Befunde ergaben auch Untersuchungen in humanen atheromatösen Veränderungen der Carotis (Fukuhara et al., 2000).

Es bestätigte sich in den letzten Jahren immer mehr, dass bei der Entstehung der Plaques verstärkt ACE und Ang II beteiligt sind.

Plaque-ACE liegt in hohen Konzentrationen in Schaumzellen vor, welche sich aus Makrophagen mit oxidiertem LDL beladen, differenzieren. Durch das vermehrte Vorhandensein von Ang II lagern sich wiederum mehr Monozyten am Endothel an, die ins Subendothel einwandern und sich zu weiteren Makrophagen entwickeln.

Ang II wird eine potenzierende Beteiligung an den inflammatorischen Prozessen der Atherogenese zugewiesen.

Zur besseren Übersicht sind diese Ang II-vermittelten Effekte hier in tabellarischer Form aufgelistet (Gibbons, 1997).

- Vasokonstriktion von glatten Muskelzellen
- Expression von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Proteinen
- Aktivierung und Migration von Makrophagen

- Expression des endothelialen ox. LDL-Rezeptors (Morawietz et al., 1999)
- Stimulation von Superoxid-Produktion, Lipid-Peroxidation und Inaktivierung von NO (oxidativer Stress)
- Stimulation von Wachstumsfaktoren und Cytokinen
- Proliferation, Migration und Hypertrophie von glatten Muskelzellen
- Matrix-Expansion und interstitielle Fibrose

Eine weitere Folge des vermehrt nachweisbaren ACE in Plaques ist die negative Auswirkung auf den Bradykininstoffwechsel. ACE baut als Kinase II Bradykinin zu inaktiven Metaboliten ab (Skidgel, 1992). Bradykinin zählt jedoch im Gegensatz zu Ang II zu den molekularen Mediatoren der endothelialen Gefäßprotektion. Es aktiviert die L-Arginin-NO-Kaskade und führt somit über cGMP Bildung zu einer Vasodilatation und Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen.

Weiterhin werden durch Bradykinin Prostacyclin und EDHF (Endothelium derived hyperpolarizing factor) freigesetzt, was eine Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und der Kontraktion glatter Muskelzellen zur Folge hat (Vane et al., 1990).

I.8 ACE-Inhibitoren

Ende der Siebziger lag mit Captopril, dem Prototyp der ACE-Hemmer, der erste blutdrucksenkende ACE-Inhibitor vor (Cushman et al., 1977). ACE-Inhibitoren der neuen Generationen, wie Enalapril oder Ramipril, unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Pharma-

kokinetik, Enzymaffinität und ihrer Darreichungsform (Brown & Vaughan, 1998). Allen liegt jedoch der gleiche Effekt, die Hemmung der Ang II- Synthese und die Erhöhung der Bradykinin-Bildung, zugrunde.

Antiatherogene Effekte dieser Substanzen konnten schon in vielen Tiermodellen nachgewiesen werden (Chobanian, 1990).

Es wurden antiproliferative, antithrombotische, plaquestabilisierende und vaskuloprotektive Wirkungen festgestellt.

Chobanian et al. (1990) untersuchten die Auswirkungen von Captopril im Watanabe hyperlipidämischen Kaninchen und fanden eine Reduktion und Stabilisierung der atherosklerotischen Läsionen.

Gleiche Resultate fanden sich auch am cholesterolgefütterten Affen (Aberg & Ferrer, 1990) und am Minischwein (Rolland et al., 1993). Im Watanabe-Kaninchen war die deutlich antiatherogene Wirkung von ACE-Hemmern mit β -Blockern oder Kalzium-Antagonisten nicht zu beobachten.

Auch im Modell des atherogen gefütterten Kaninchen konnten schon vaskuloprotektive Effekte gezeigt werden. Riezebos et al. (1994) zeigte eine deutliche Reduzierung von Plaques in der Aorta und eine Verbesserung der endothelabhängigen Relaxation unter der Behandlung mit Ramipril.

Ebenso konnte Becker et al. (1991) in solchen Tieren eine Erhöhung von cGMP im Endothel der Aorta nachweisen. Zurückzuführen ist dies wohl auf eine lokal gesteigerte Aktivität von NO (= EDRF= Endothelium derived relaxing factor) (Vargas et al., 1991). Diese wird wiederum hervorgerufen durch die erhöhte endotheliale Bradykinin-Aktivität infolge der ACE-Hemmung durch Ramipril (Busse et al.,

1993). Letztendlich kommt es zu einer verstärkten Vasodilatation und einer Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen. Auch in vitro zeigte sich eine erhöhte cGMP-Bildung in Endothelzellen, die durch Ramipril und Bradykinin gesteigert wurde. Weiterhin konnte eine erhöhte NO-Freisetzung in Endothelzellen nachgewiesen werden (Wiemer et al., 1996).

Diese experimentellen Beobachtungen weisen auf die direkte antiatherosklerotische und gefäßprotektive Wirkung von ACE-Inhibitoren hin.

Gegenstand von klinischen Studien musste es nun sein, diese These zu bestätigen.

In der HOPE-Studie (Heart Outcomes Prevention Evaluation) wurde der ACE-Hemmer Ramipril in atherosklerotischen Risikopatienten eingesetzt (The heart outcomes prevention evaluation study investigators, 2000). 9297 Patienten mit mindestens einer kardiovaskulären Erkrankung wie koronare Herzkrankheit oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit wurden über fünf Jahre mit 10 mg pro Tag Ramipril oder einem Placebo behandelt. Primäre Endpunkte waren Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Tod aus kardiovaskulären Gründen. Die Patienten wurden alle zusätzlich zu ihren bisherigen Medikamenten wie Lipidsenker oder β -Blocker mit Ramipril behandelt. In allen primären, ebenso wie in den sekundären (Herzinsuffizienz, Diabeteskomplikationen, Revaskularisation) Endpunkten wurde eine Verminderung der kardiovaskulären Ereignisse bei der Therapie mit Ramipril um 20-30 % erreicht (Yusuf, 2001).

Diese Ergebnisse fanden Bestätigung in der SECURE-Studie. Hier wurde gezeigt, dass die Atheroskleroseprogression in den Carotiden durch Ramipril deutlich vermindert wird (Lonn et al., 2001).

Auch Patienten mit stabiler Angina pectoris (APRES-Studie) zeigten nach Revaskularisierungsmaßnahmen wie Bypass unter der Behandlung mit ACE-Inhibitoren eine signifikante Senkung des Sterberisikos durch kardiovaskuläre Ursache, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz (Kjøller-Hansen et al., 2000).

Diese Studien zeigen deutlich, dass durch den Einsatz von ACE-Hemmern die Prognose von Patienten mit einem hohen Risiko für atherosklerotische kardiovaskuläre Erkrankungen signifikant verbessert werden kann.

I.9 ACE-NEP-Inhibitoren

Die Vasopeptidase-Inhibitoren hemmen neben dem ACE zusätzlich die neutrale Endopeptidase (NEP). Die NEP spaltet und inaktiviert natriuretische Peptide, so dass durch die Hemmung dieser das Vorliegen natriuretischer Peptide erhöht wird. Drei strukturverwandte natriuretische Peptide sind bekannt. Das ANP (atriales natriuretisches Peptid), welches in den Vorhöfen bei Dehnung durch Volumenerhöhung freigesetzt wird. BNP (brain natriuretisches Peptid) wird im Gehirn und in den Herzventrikeln produziert und ebenfalls bei Dehnung ausgeschüttet. CNP (C-Typ natriuretische Peptid) konnte in Lunge, Niere, Herz und im Gefäßendothel nachgewiesen werden. Es wird freigesetzt, wenn Scherkräfte z.B. bei Kreislaufbelastungen auf das Endothel wirken (Chen & Burnett, 1998). Die natriuretischen Peptide wirken antagonistisch zu Ang II. ANP und BNP bewirken eine Vasodilatation, Verbesserung der Relaxation der Ventrikel, Senkung von Vor- und Nachlast des Herzens und des Blutdrucks, eine Hemmung der Sekretion von Renin

und Aldosteron und eine Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate (Levin et al., 1998). Nach der Aussage von Prof. Dr. Milton Packer, New York, ist der Name „natriuretisch“ nicht sehr passend, denn nicht die Natriurese, sondern die Vasodilatation sei die wichtigste Wirkung dieser Peptide (Heinzel, 2000).

CNP bewirkt eine Vasodilatation sowohl im arteriellen wie auch im venösen Schenkel. Ein weiterer Einfluss auf die endotheliale Funktion und antiproliferative Wirkung von CNP werden diskutiert. Cao und Gardner (1995) zeigten, dass natriuretische Peptide das Fibroblastenwachstum bei der Herzhypertrophie reduzieren, was man als eine antiproliferative bzw. organoprotektive Wirkung interpretiert.

Die natriuretischen Peptide gehen eine Bindung mit Rezeptoren der Zelloberfläche ein, welche an die partikuläre Guanylatcyclase gebunden sind. Dadurch wird vermehrt Guanosintriphosphat (GTP) zu cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) umgewandelt, was wiederum zu einer Vasodilatation führt (Stein & Levin, 1998).

Durch den Einsatz von NEP-Inhibitoren im Affen konnte ein Anstieg von ANP im Plasma und dessen Ausscheidung im Urin nachgewiesen werden. Wurde humanes ANP infundiert, kam es zu einer Erhöhung von cGMP und Natrium im Urin sowie zu einer Potenzierung der blutdrucksenkenden Wirkung der natriuretischen Peptide (Seymour et al., 1995).

Um synergistische Wirkungen zu nutzen, wurden kombinierte ACE-NEP-Inhibitoren entwickelt.

Die hämodynamischen Effekte der kombinierten ACE-NEP-Hemmung sind wesentlich ausgeprägter, als diejenigen, welche durch

die Hemmung der einzelnen Enzyme zu erzielen sind (Trippodo et al., 1995; Fink et al., 1996; Fournie-Zaluski et al., 1996).

Zu den bisher am besten charakterisierten Vertretern dieser neuen Substanzklasse zählt das Omapatrilat.

Omapatrilat zeigt einen protektiven Effekt auf die Endothelfunktion, der über den durch die Blutdrucksenkung zu erwartenden Effekt hinaus geht: In salzsensitiven Dahl-Ratten ist die endothelabhängige Relaxation von Aorta und Mesenterialgefäßen bei Omapatrilat behandelten Tieren deutlich besser als in der mit Captopril (ACE-Hemmer) therapierten Gruppe (Quaschnig et al., 1999).

Auch andere Effekte, wie eine verbesserte myokardiale Funktion bei Hunden mit induzierter Herzinsuffizienz (Thomas et al., 1998) oder eine Verminderung des linksventrikulären Druckes bei kardiomyopathischen Hamstern, konnten nachgewiesen werden. Alle Veränderungen waren mit Omapatrilat ausgeprägter als in der alleinigen Therapie mit ACE- oder NEP-Inhibitoren (Trippodo et al., 1995).

Ähnliche Wirkungen konnten bei klinischer Herzinsuffizienz, mit jedoch relativ kleinen Patientenzahlen, belegt werden (Ikram et al., 1999; Norton et al., 1999).

Eine weitere Bestätigung für die Überlegenheit der ACE-NEP-Inhibitoren lieferte die erste große klinische Studie.

In der IMPRESS-Studie (Inhibition of MetalloProtease by omapatrilat in a Randomized Exercise and Symptom Study in subjects with heart failure) wurden 573 Herzinsuffizienzpatienten mit Omapatrilat im Vergleich zu Lisinopril (ACE-Hemmer) behandelt. Hinsichtlich der kombinierten Endpunkte Symptome,

Morbidität und Mortalität zeigte sich eine bessere Wirksamkeit für Omapatrilat (Mitchell et al., 1999; Rouleau et al., 1999).

Mit OPERA (Omapatrilat in Persons with Enhanced Risk of Atherosclerotic events) ist die z.Zt. größte klinische Studie initiiert worden. Hier wird an ca. 12.600 Personen mit isolierter systolischer Hypertonie der Einfluss von Omapatrilat auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität untersucht. Der Untersuchungszeitraum dieser Studie wurde auf fünf Jahre festgelegt (Plouin et al., 2000).

I.10 Tiermodell

Die Herausforderung bei der Suche nach Tiermodellen für Atherosklerose besteht darin, solche zu finden, die der humanen Erkrankung möglichst ähnlich sind, um die komplexe Entwicklung der Läsionen präzise nachahmen zu können.

Auch wenn kein Modell die humanen Geschehnisse perfekt replizieren kann, sind sie äußerst nützlich für die Aufklärung der speziellen pathologischen Prozesse der Krankheit (Bocan et al., 1998).

1908 entdeckte Ignatowski, dass bei Kaninchen nach Fütterung von Fett oder Eigelb in den großen Arterien Atherome zu finden sind

(Ignatowski, 1908). Ab 1913 wurde das Kaninchen intensiv als Modell der Atheroskleroseforschung benutzt. Zu diesem Zeitpunkt zeigte Anitschkow, dass durch eine kurzzeitige Cholesterinfütterung, sich lipidgefüllte Zellen, die sog. Schaumzellen, in der Aorta formatieren (Anitschkow & Chalатов, 1913).

Man stellte in den folgenden Jahren fest, dass beim Kaninchen mit die besten reproduzierbaren und dem Menschen ähnlichsten

Ergebnisse zu finden waren. Die im Kaninchen erzeugbaren atherosklerotischen Läsionen erinnern stark an die humanen Läsionen Typ I-III.

Kritchevsky beschäftigte sich lange Zeit mit der Zusammensetzung der atherogenen Diät und fand heraus, dass sich besonders durch den Zusatz von Kokosöl deutliche intrazelluläre Lipideinlagerungen und intimale Proliferationen erzeugen lassen (Kritchevsky et al., 1976).

Es zeigte sich, dass eine Erhöhung des Cholesterins im Futter von 1 auf 3% und eine Erhöhung des Fettes von 4 auf 8% über einen Zeitraum von sechs Wochen eine Steigerung des Plasmacholesterins um das Dreifache verursachte (Jokinen et al., 1985). Die Folge davon ist die Akkumulation von Cholesterinestern in der Leber und im peripheren Gewebe (Kroon et al., 1985) und die Entwicklung von Schaumzellen, den Vorläufern erster atherosklerotischer Läsionen in der Aorta.

Atherogen gefütterte Kaninchen zeigen primär eine Verschlechterung der endothelabhängigen Relaxation und die anschließende Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen (Jayakody et al., 1985). Andere Forschungsgruppen konnten diese Ergebnisse bestätigen (Freimann et al., 1986 & Verbeuen et al. 1990).

Seit 1973 gibt es das durch eine Mutation entstandene WHHL Kaninchen („Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit“), welches eine genetisch bedingte Hypercholesterinämie entwickelt (Watanabe, 1980). Diese Tiere sind jedoch zur Zeit in Deutschland nicht breit verfügbar.

Es wurden auch Studien durchgeführt, in denen durch Ballondilatation ein Endothelschaden verursacht wird, was eine neo-

intimale Reaktion und die Ausbildung von Plaques zur Folge hat (de Smet et al., 1998).

Insgesamt jedoch ist das Modell des atherogen gefütterten Kaninchens ein sehr gut erforschtes und das am weitesten verbreitete Tiermodell der Atherosklerose, insbesondere in Hinblick auf die Auswertung pharmakologischer Effekte.

Für die geplanten Untersuchungen schien somit dieses Modell am geeignetsten zu sein. Von Vorteil ist, dass über einen relativ kurzen Zeitraum (6 Wochen) atherosklerotische Läsionen entstehen. Zudem besteht die Möglichkeit, über einen längeren Zeitraum (12 Wochen) die zu untersuchenden Substanzen durch das Zufügen ins Futter den Kaninchen zu verabreichen.

Da eine Ernährungsumstellung bei einer klinischen Atherosklerosetherapie dringend notwendig ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die Kaninchen zum Zeitpunkt des Therapiestartes wieder mit Normalfutter gefüttert.

Die meisten bisher durchgeführten Studien am atherogen gefütterten Kaninchen haben dies nicht berücksichtigt und die Behandlungseffekte nur zusätzlich zur atherogenen Ernährung untersucht (Becker et al., 1991; Finta et al., 1993).

I.11 Fragestellung

Die Atherosklerose mit ihren klinischen Folgen stellt eines der größten medizinischen Probleme unserer Gesellschaft dar.

Durch Reduzierung der Risikofaktoren (Einsatz von Antihypertensiva, Lipidsenkern sowie einer cholesterinarmen Ernährung) können zwar mittlerweile durch Atherosklerose verursachte Krankheiten vermindert werden, jedoch sind die z.Zt. zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten nicht ausreichend.

Zahlreiche Untersuchungen in Tiermodellen und klinischen Studien zeigen, dass ACE-Hemmer wie das Ramipril direkt gefäßschützend wirken und somit positiv in das Geschehen der Atherosklerose eingreifen. Es gibt auch Untersuchungen zu NEP-Inhibitoren im atherogenen Tiermodell (Kugiyama et al., 1996), allerdings noch nicht zu kombinierten ACE-NEP-Inhibitoren, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

Durch die zusätzliche Hemmung der neutralen Endopeptidase bei den ACE-NEP-Inhibitoren erhofft man den vaskulo-protektiven Effekt weiter verstärken zu können. Klinische Studien hierzu sind bereits initiiert worden (OPERA-Trial, Plouin et al., 2000). In dieser Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

Ist die positive Wirkung von Ramipril auf die endotheliale Dysfunktion im atherogen gefütterten Kaninchen reproduzierbar?

Beeinflusst AVE 7688, ein ACE-NEP-Inhibitor der Firma Aventis Pharma, vergleichbar wirksam wie Ramipril die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion im atherogen gefütterten Kaninchen?

Um diese Fragen beantworten zu können, wurden an den Kaninchen verschiedene spezifische Untersuchungen durchgeführt und bewertet.

Die Ergebnisse wurden im Besonderen unter folgenden Gesichtspunkten beurteilt:

Wird die Endothelfunktion der isolierten Aorten von Ramipril- und AVE 7688 behandelten Tieren verbessert?

Sind die Plaques in den Aorten der mit Ramipril- und AVE 7688 behandelten Tiere reduziert?

Wird die NO-Freisetzung in den Aorten durch die Behandlung mit Ramipril und AVE 7688 verstärkt und die O_2^- -Freisetzung reduziert?

Werden Gesamtcholesterin, Triglyceride, HDL- und LDL-Fraktionen durch die Behandlung mit Ramipril oder AVE 7688 beeinflusst?

Weisen die Ergebnisse weiterer Untersuchungen auf eine vaskuloprotektive Beeinflussung durch die Behandlung mit Ramipril oder AVE 7688 hin?

II Material und Methoden

II.1 Versuchstiere und Fütterungsprotokoll

II.1.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 57 männliche Kaninchen („Weiße Neuseeländer“) verwendet, die in einem Alter von 10-12 Wochen in den Fütterungsversuch eingesetzt wurden.

Die Tiere wurden von Harlan Winkelmann GmbH geliefert.

Alle Untersuchungen wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

II.1.2 Tierhaltung

Die Kaninchen wurden einzeln in Milieukäfigen der Firma Scanbur gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 20-22°C, die relative Luftfeuchtigkeit 70-80 %, der Tag-Nacht-Rhythmus 12 Stunden, von 7.00 – 19.00 Uhr, aufrechterhalten durch Kunstlicht (400 Lux).

II.1.3 Tierfütterung

Alle verwendeten Futtermittel wurden von der Firma Altromin GmbH (Lage) bezogen.

Das Standardfutter (Altromin 2023) enthält 17,5 % Rohprotein, 4 % Rohfett, 14,5 % Rohfaser und 9 % Rohasche.

Die Arzneistoffe wurden in entsprechender Menge in das Futter eingemischt und in Pellets gepresst.

Von Ramipril erhielten die Kaninchen eine Dosis von 3 mg/kg KGW täglich, was einer Futterzumischung von 0,0075 % Substanz bei einer Futteraufnahme von 4 % des Körpergewichts pro Tag entspricht.

Von AVE 7688 erhielten die Kaninchen eine Dosis von 30 mg/kg KGW täglich, was einer Futterzumischung von 0,075 % Substanz bei einer Futteraufnahme von 4 % des Körpergewichts pro Tag entspricht.

Folgende Futtersorten wurden verwendet:

- Standardfutter
- Standardfutter mit 0,25 % Cholesterin und 3 % Kokosnussöl
(= Atherogene Diät)
- Standardfutter + Ramipril
- Standardfutter + AVE 7688

Die Tiere erhielten Wasser ad libitum.

Futter- und Wasseraufnahme wurden regelmäßig kontrolliert.

II.2 Studiendesign

Alle Tiere (außer den Standard-gefütterten Kontrolltieren) wurden nach einer Eingewöhnungsphase von ca. vier Wochen, zunächst 6 sechs Wochen mit atherogener Diät gefüttert.

Dieser Zeitraum reichte zur Manifestation deutlicher Plaques im cranialen Teil der Aorta aus (Chen M.-F. et al. 1999). Das bestätigten auch nicht veröffentlichte Vorversuche bei Aventis.

Anschließend wurden die Tiere für weitere 12 Wochen wieder auf Kontrollfutter gesetzt, wobei jeweils eine Gruppe Ramipril bzw. AVE 7688 zusätzlich erhielt.

Daraus ergab sich folgende Gruppeneinteilung:

Gruppenbezeichnung	Futterart
Gruppe 1 (n=11)	Standardfutter (18 Wo)
Gruppe 2 (n=13)	Atherogene Diät (18 Wo)
Gruppe 3 (n=11)	Atherogene Diät (6 Wo);Standard-futter (12 Wo) = Variiert
Gruppe 4 (n=11)	Atherogene Diät (6 Wo);Standard-futter + Ramipril (12 Wo)
Gruppe 5 (n=11)	Atherogene Diät (6 Wo);Standard-futter + AVE 7688 (12 Wo)

Tab.2 : Gruppeneinteilung

Nach den ersten sechs Wochen, noch vor dem Start der Substanzbehandlung, und am Ende der Studie wurde eine Blutentnahme über die Arteria auricularis centralis zur Bestimmung von Cholesterin, Triglyceriden, Lipoproteinen und der ACE-Aktivität durchgeführt.

Nach der 18-wöchigen Behandlungszeit erfolgte die Enduntersuchung. Bei den Tieren wurden zunächst unter Narkose Blutdruckmessungen durchgeführt. Im Anschluss wurde die Aorta für funktionelle Versuche im Organbad, Plaqueanfärbung und NO-Bestimmung entnommen. Danach schloss sich die Sektion an.

In Abb. 1 ist der allgemeine zeitliche Versuchsablauf dargestellt.

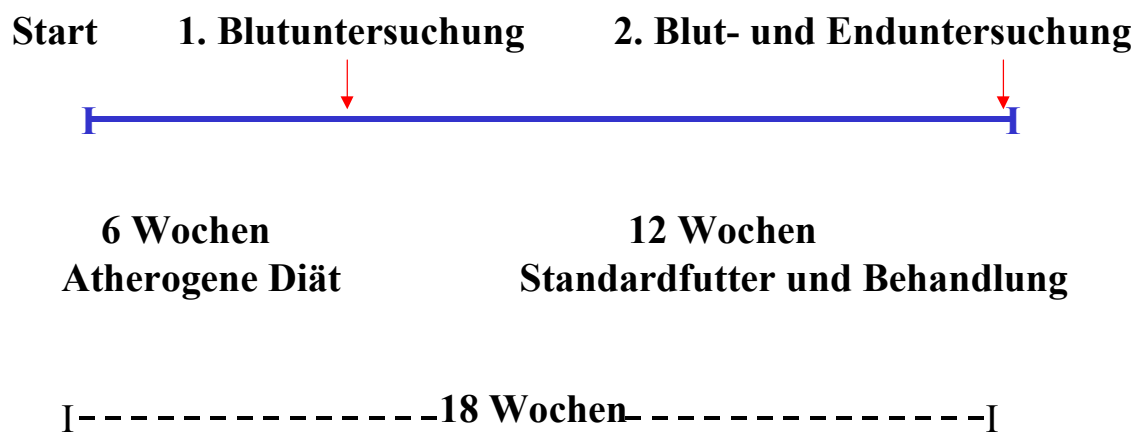


Abb. 1 : Allgemeiner zeitlicher Verlauf der Studie

II.3 Verwendete Substanzen

II.3.1 *Ramipril*

Der ACE-Inhibitor Ramipril ist ein Blutdrucksenker der Aventis Pharma Deutschland GmbH. Die chemische Bezeichnung ist (2S,3aS,6aS)-1((S)-N-((S)-1-carboxy-3-phenylpropyl)-alanyl)-octahydrocyclopenta(b)pyrrol-2-carbonsäure-1-ethylester.

Die chemische Summenformel lautet $C_{23}H_{32}N_2O_5$.

Das Molekulargewicht beträgt 416,5 g/mol.

Ramipril ist ein Hemmstoff des Angiotensin-Konversionsenzyms, welches das inaktive Angiotensin I in das biologisch aktive Angiotensin II umwandelt. Die Hemmung erfolgt durch Bindung mit einer Carboxylgruppe an das Zink im aktiven Zentrum des Enzyms. Wie alle ACE-Hemmer wirkt Ramipril über diesen Mechanismus blutdrucksenkend. Die Resorption der „Pro-Drug“ Ramipril erfolgt schnell und wird durch gleichzeitig eingenommene Nahrung nicht signifikant beeinflusst. Die eigentliche Wirksubstanz Ramiprilat entsteht durch Hydrolyse hauptsächlich in der Leber. Ramipril wird fast vollständig metabolisiert und vorzugsweise renal eliminiert.

Ramiprilat ist ein langsam bindender aber hochaffiner Inhibitor, dessen Hemmung kompetitiv ist. Die Bindung von Ramiprilat an ACE erfolgt über einen Zwischenschritt. Zunächst bindet der Inhibitor rasch an das Enzym und bildet einen initialen Enzym-Inhibitor Komplex, der sich durch Isomerisierung langsam umlagert und so einen stabilen Enzym-Inhibitor-Komplex bildet, der nur sehr langsam wieder dissoziiert. Ein Maß für die Stärke der Bindung eines ACE-Hemmers an das Konversionsenzym ist die allgemeine

Hemmkonstante K_i . Der K_i -Wert für Ramiprilat bezüglich ACE-Hemmung ist 7 pmol/L.

Die chemische Summenformel für Ramiprilat ist $C_{21}H_{28}N_2O_5$ und das Molekulargewicht beträgt 388,5 g/mol.

Die Dosierung von 3 mg/kg/d Ramipril für das Kaninchen stützt sich auf Literaturhinweise (Becker et al., 1991; Finta et al., 1993) sowie auf eigene Erfahrungen der Firma Aventis.

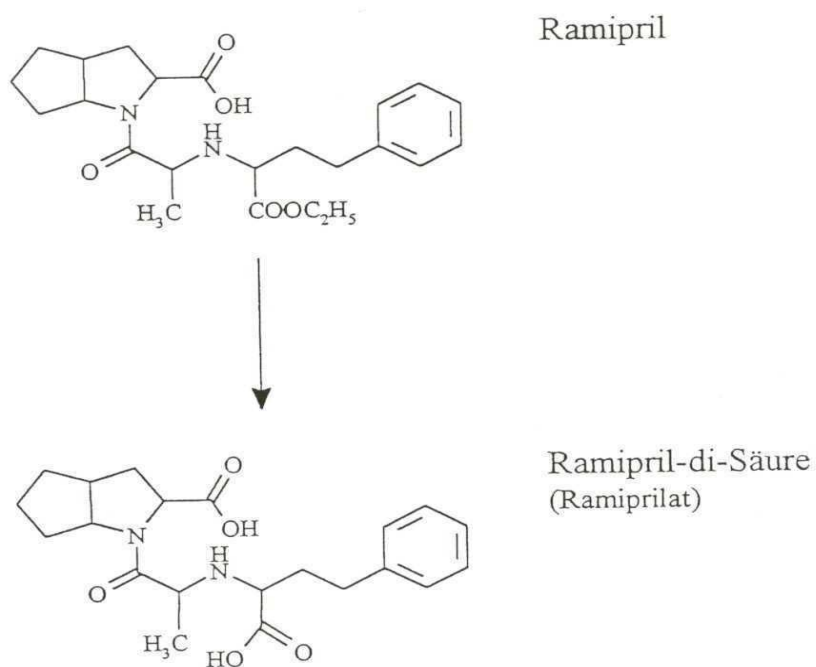


Abb 2 : Strukturformeln Ramipril + Ramiprilat

II.3.2 ACE-NEP-Inhibitor AVE 7688

Der ACE-NEP-Inhibitor AVE 7688 ist eine Entwicklungssubstanz der Aventis Pharma GmbH und wird auch unter der Bezeichnung MDL 107,688 geführt. AVE 7688 ist ebenfalls eine Prodrug; es ist einerseits Hemmstoff des Angiotensin-Konversionsenzyms, andererseits hemmt es zusätzlich die neutrale Endopeptidase (NEP). Diese baut Bradykinin, das atriale natriuretische Peptid (ANP), das „brain“ natriuretische Peptid (BNP) und das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) ab. Der aktive Metabolit im Plasma ist MDL 108,048. Es handelt sich bei dieser Substanz ebenfalls um ein Antihypertonikum (aus patentrechtlichen Gründen ist keine Struktur- und Summenformel dieser Substanz aufgeführt).

Die Dosis für AVE 7688 wurde vorab in einem Fütterungsversuch ermittelt.

Getestet wurden 3, 10 und 30 mg/kg/d AVE 7688 im Futter.

Bei einer Dosis von 30 mg/kg/d war die ACE-Aktivität im Blut vollständig gehemmt (diese Daten stammen aus einer nicht veröffentlichten Studie der Firma Aventis).

In der abschließenden Blutuntersuchung der vorliegenden Studie wurden die Plasmakonzentrationen von MDL 108.048 bestimmt. Der Mittelwert lag bei $0,15 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$. Bei dieser Plasmakonzentration wird die ACE-Aktivität fast vollständig gehemmt.

II.4 Blutentnahme

Während der Studie erfolgte eine zweimalige Blutuntersuchung.

Das erste Mal in der 6. Woche, vor dem Start der Behandlung. Hierfür wurden die Kaninchen mit 33 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Hostaket®, Firma Intervet, Unterschleißheim; 115,34 mg Ketaminhydrochlorid/1 mL) und 2,6 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%, Firma Bayer, Leverkusen; 23,32 mg 5,6-Dihydro-2-(2,6-xylydino)-4H-1,3-thiazin-hydrochlorid/1mL) i.m. narkotisiert. Das Gebiet um die zentrale Ohrarterie wurde rasiert und desinfiziert. Anschließend wurde ein Katheter (Surflo G 24 Ø 0,67 mm, Firma Terumo, Leuven, Belgium) zur Blutentnahme in das Gefäß eingeführt. Aufgefangen wurde das Blut jeweils in einem EDTA-Plasma Röhrchen (1,6 mg Kalium-EDTA/mL Blut, Firma Sarstedt) und einem Serum-Gel Röhrchen (S/4.4 mL, Firma Sarstedt), um es dann bei 3000 Umdrehungen/Minute für eine Dauer von 10 Minuten zu zentrifugieren. Diese Blutentnahme diente zur Bestimmung von Cholesterin, HDL, LDL und Triglyceriden.

Die zweite Blutentnahme fand im Rahmen der Enduntersuchung statt und wurde am bereits narkotisierten Tier nach den Messungen von Blutdruck und Herzfrequenz in gleicher Weise durchgeführt.

Diesmal wurden zusätzlich zu Cholesterin, HDL, LDL und Triglyceriden die ACE-Aktivität, Big-Endothelin und der von-Willebrand-Faktor bestimmt.

II.5 Messung von Blutdruck und Herzfrequenz

Die Tiere wurden mit 65,9 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Hostaket®, Firma Intervet, Unterschleißheim; 115,34 mg Ketaminhydrochlorid/1 mL) und 5,3 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun 2 %, Firma Bayer, Leverkusen; 23,32 mg 5,6-Dihydro-2-(2,6-xylidino)-4H-1,3-thiazinhydrochlorid/1mL) i.m. einleitend narkotisiert. Die Kaninchen wurden im cervicalen, thorakalen und abdominalen Bereich medial und linksseitig rasiert (Elektrische Haarschneidemaschine, Elektra II, Schneidekopf GH 700, Firma Aesculap). Danach wurden die Tiere mittels eines beheizbaren OP-Tisches (Firma FMI-Instruments, Ober-Beerbach) mit rektalem Temperaturfühler auf 38°C Körpertemperatur gehalten.

Zur weiteren Durchführung des Eingriffs wurden ein Rippenspreizer, zwei chirurgische Scheren, eine Präparierschere, ein Nadelhalter, zwei Mikroskopierpinzetten, eine feine chirurgische Pinzette und eine Mini-Bulldogklemme benötigt (Operationsbesteck von Aesculap, Tuttlingen). Die Kaninchen wurden zunächst in Rückenlage positioniert. Als Lichtquelle diente eine Kaltlichtlampe (Firma Schott, Mainz).

Es wurde ein Hautschnitt mit der chirurgischen Schere an der Halsunterseite durchgeführt, dann wurden der M. Sternohyoideus und M. Omohyoideus ebenfalls mit der chirurgischen Schere auseinandergespreizt. Um die so freipräparierte Trachea wurde ein Faden (Steppzwirn, Firma Hoogen) geführt. Mit der zweiten chirurgischen Schere wurde die Tracheotomie durchgeführt; der Trachealtubus der Beatmungspumpe (Universal-Respirator, Firma FMI-Instruments, Ober-Beerbach) wurde in die Trachea eingeführt und mit dem vorgelegten Faden fixiert.

Die Narkose der Tiere wurde von nun an als Inhalationsnarkose fortgesetzt. Sie wurden mit 0,25 %/kg Isofluran, 0,5 L/min O₂ und 7 L/min Luft bei einer Frequenz von 35 x/min und einer Inspirationsrate von 35 % beatmet. Am rechten Ohr wurde in die Vena auricularis lateralis ein Venenverweilkatheter (Surflo G 26 Ø 0,64 mm, Firma Terumo, Leuven, Belgium) eingeführt. Dieser venöse Zugang diente der später beschriebenen Gabe von Angiotensin I und Bradykinin.

Die Arteria carotis communis sinistra wurde nun freipräpariert, mit der Mini-Bulldogklemme abgeklemmt und mit den Mikroskopierpinzetten leicht vorgelagert. Anschließend wurde ein Polyethylenkatheter (Eigenbau, Luer-Kanüle Nr. 2, Firma Neopoint + Mikroschlauch) eingeführt und mit einem Faden (Polycord Nähzwirn, Firma Hoogen) fixiert. Über einen Druckumwandler (Combitrans®-Einwegtransducer, Firma Braun, Melsungen) wurden elektrische Signale zu einem elektronischen Differenzierungssystem Plugsys (Firma Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) weitergeleitet, welches mit einer entsprechenden PC-Software (Haemodyn®W, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) verbunden war. Damit wurden die Werte von Blutdruck und Herzfrequenz registriert und gespeichert. Nach Messung der basalen Werte wurden 130 ng/kg Angiotensin I i.v. verabreicht und die Blutdruckveränderungen aufgezeichnet. Nach Wiederherstellung des Ausgangswertes wurden 250 ng/kg Bradykinin i.v. injiziert und ebenfalls die Veränderungen des Blutdruckes abgespeichert. Zur Tötung des Tieres wurde unter äußerster Schonung der Aorta das Herz entfernt und das Kaninchen entblutet.



Abb. 3 : Kaninchen mit Beatmungspumpe und Blutdruckkatheter

II.6 Sektion

Den Tieren wurde das Herz, Lunge, Leber, Nieren und Nebennieren entnommen. Die Organe wurden gewogen, in 4%igem Formalin fixiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

II.7 Funktionelle Untersuchungen der isolierten Aorten

II.7.1 Substanzen und Lösungen

Als Pufferlösung fand eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Krebs & Henseleit, 1932) Verwendung mit folgender Zusammensetzung (mmol/L): Natriumchlorid $[\text{NaCl}]$ (113,79), Natriumhydrogencarbonat $[\text{NaHCO}_3]$ (22,02), Glucose (5,05), Kaliumchlorid $[\text{KCl}]$ (4,69), Kaliumhydrogenphosphat $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ (1,21), Magnesiumsulfat $[\text{MgSO}_4]$ (2,24), Kalziumchlorid $[\text{CaCl}_2]$ (2,52) (Firma Riedel-de Haën, Seelze), die täglich frisch mit destilliertem Wasser angesetzt wurde. Der pH-Wert der Lösung wurde unter Carbogenbegasung (95% O_2 / 5% CO_2) auf 7,4 eingestellt.

Des weiteren wurden im Versuch (in den angegebenen Endkonzentrationen im Organbad) verwendet:

- Phenylephrin $[\text{Phe}]$ (100 nM) (Firma Sigma, Deisenhofen)
- Acetylcholin $[\text{Ach}]$ (10 nM, 100 nM, $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$) (Firma Sigma, Deisenhofen)
- Sodium Nitroprussid $[\text{SNP}]$ (10 nM, 100 nM, $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$) (Firma Sigma, Deisenhofen)

- Indomethacin [1 μ M] (Firma Sigma, Deisenhofen)
- Angiotensin I [Ang I (100 nM, 1 μ M)]
(Firma Sigma, Deisenhofen)

II.7.2 Versuchsaapparatur

Die hier benutzte Apparatur setzte sich aus folgenden Geräten und Materialien zusammen:

- 12 isometrische Kraftsensoren
(Typ: TM 05-50, Firma FMI, Hanau)
- 12 Verstärker (BioAmp-0,4/8, Firma FMI, Hanau)
- Software (IBJ Be Mon Datenerfassung, Firma FMI, Hanau)
- 12 doppelwandige Organbäder, mit einem maximalen Füllungsvolumen von 10 mL
- 24 rostfreie Stahlserrefinehäkchen (Firma FMI, Hanau)
- Umlaufthermostat mit Wasserbad zur Aufrechterhaltung einer konstanten Gefäßbadtemperatur von 37°C (Firma Lauda GmbH, Königshofen)
- Nylonfaden zur Fixierung der Aortensegmente (Firma Ethicon, Norderstedt)
- 10 l Flüssigkeitsvolumen fassendes Krebs-Henseleit-Lösungs-Vorratsgefäß (Rotilabo-Ballonflaschen, Firma Roth)



Abb.4 : Anlage zur funktionellen Untersuchung von Blutgefäßen

II.7.3 Präparation der Aorta

Bei der Entfernung des Herzens war es sehr wichtig, die Durchtrennung der Aorta so weit wie möglich proximal, d.h. unmittelbar nach Abgang der Aorta aus dem Herzen, durchzuführen. Die thorakale Aorta wurde, ohne Zug oder Dehnung auszuüben, aus dem Tier entnommen und in eine Präparierschale gelegt, welche mit Krebs-Henseleit-Pufferlösung gefüllt war. Das Gefäß wurde sofort langsam mit einer 1 mL- Spritze (Firma Braun, Melsungen) und einer sterilen Einmalkanüle (Luer Nr.1, Firma Neopoint) durchspült und mit Hilfe einer Federschere (Firma Aesculap, Tuttlingen) von umgebendem Fett- und Bindegewebe vorsichtig befreit. Ein Teilstück der thorakalen Aorta wurde am Übergang des Aortenbogens in die Aorta descendens herausgenommen, um aus diesem mit einem Skalpell (Firma Aesculap, Tuttlingen) vier gleichgroße ca. 4-5 mm lange Aortensegmente zu präparieren. Während der gesamten Präparationszeit wurden die Gefäßstücke von Krebs-Henseleit-Lösung umspült und die Pufferlösung mehrmals gewechselt. Jeder Aortenring wurde nun mit einer Mikrofederschere (Firma Aesculap, Tuttlingen) vorsichtig geöffnet, so dass ca. 1 cm lange Streifen entstanden. Jeder einzelne Aortenstreifen wurde zwischen zwei rostfreien Stahlserrefinehäkchen aufgezogen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass weder das Gefäß gedehnt, noch das Endothel berührt wurde. Um die Gefäßstücke in die Apparatur einhängen zu können, wurde eines der Serrefinehäkchen mittels eines kleinen Hakens im Organbad befestigt, das andere Häkchen wurde mittels eines Nylonfadens mit dem Kraftsensor verbunden. Hierbei war darauf zu achten, die Aortenringe locker einzuhängen, um eine evt. Vorspannung zu vermeiden.

Nach dem Einbringen in das Organbad wurden die Gefäßstreifen schrittweise auf 2 g vorgedehnt (Riezebos et al., 1994; Nickenig et al., 1997). Dies erfolgte in einem Zeitraum von ca. 120 min., indem die Pufferlösung mehrmals ausgetauscht wurde. Nach Erreichen des stabilen Ausgangsniveaus wurde mit den Kontraktionsversuchen begonnen.

II.7.4 Versuchsprotokoll

Alle Versuche wurden in Gegenwart von Indomethacin (1 μ M), einem Inhibitor der Cyclooxygenase durchgeführt, wodurch die Synthese endogener Prostaglandine unterbunden wurde.

Zunächst wurden je zwei Streifen pro Tier mit dem α -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin (100 nM, Endkonzentration im Bad) kontrahiert. Nach Erreichen eines Gleichgewichtszustandes wurde Acetylcholin kumulativ in Endkonzentrationen von 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M ins Bad pipettiert. Nach Ausbildung eines Plateaus wurde jeweils die nächsthöhere Acetylcholinkonzentration hinzugegeben bis zur maximal erreichbaren Gefäßrelaxation. Daraufhin wurde die Badlösung ausgetauscht und die Ringe gespült bis sich erneut der Basiswert eingestellt hatte. Nach einer 30-minütigen Ruhephase wurde erneut mit Phenylephrin (100 nM) kontrahiert. Diesmal wurde nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes kumulativ Sodium-nitroprussid in Endkonzentrationen von 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M ins Bad pipettiert. Anschließend wurde die Badlösung erneut ausgetauscht und die Ringe bis zur Einstellung des Basiswertes gespült. Nach einer weiteren 30-minütigen Ruhephase wurden zwei Ringe pro Tier mit Ang I (100 nM und 1 μ M), im

Vergleich zu den funktionellen Untersuchungen in der Blutdruckmessung, inkubiert.

Die in Gramm gemessenen Kontraktionen (in Bezug zum Basalwert von 2 g) und Relaxationen (in Bezug zum maximalen Kontraktionsplateau) wurden in Prozent angegeben.

II.8 Plaquetfärbung

II.8.1 Aortenfärbung mit Ölrot

Es wurden täglich zwei Lösungen frisch (Färbe- und Waschlösung) für den Färbevorgang angesetzt.

Färbelösung : 0,6 g Ölrot (Firma Sigma, Deisenhofen) wurde in 180 mL Isopropanol (2-Propanol, Firma Riedel-de Häen, Seelze) in einem Erlmeyerkolben gelöst und über Nacht stehen gelassen.

Vor der Färbung wurde die Lösung mit 120 mL destilliertem Wasser gemischt, fünf Minuten ruhen gelassen und anschließend über einem Papierfilter gefiltert.

Waschlösung : 180 mL Isopropanol (2-Propanol) wurden mit 120 mL destilliertem Wasser in einem Erlmeyerkolben vermischt.

Der noch übrige Teil der thorakalen sowie die gesamte abdominale Aorta wurden von Fett- und Bindegewebe befreit, in Längsrichtung aufgeschnitten und mit der luminalen Seite nach unten in eine mit Färbelösung gefüllte Petrischale gelegt. Nach sechs Stunden wurde die Aorta in eine Petrischale mit Waschlösung für ca. drei Min. überführt und dann in destilliertem Wasser bis zum Erstellen der Fotos aufbewahrt. Da nur im Aortenbogen Verfärbungen zu erkennen waren, wurde nur dieser zur weiteren Untersuchung herangezogen.

II.8.2 Bestimmung der Plaquegröße

Zur Bestimmung der Plaquegröße wurde der Aortenbogen jedes Tieres in der oben beschriebenen Weise angefärbt. Danach wurde der Aortenbogen vorsichtig abgetrocknet, in einer Petrischale positioniert und eine Aufnahme gemacht (Colour Camera, Firma Sony). Danach wurde sowohl die Fläche des Aortenbogens als auch die Plaquefläche mit Hilfe eines Bildanalysesystems (Leica Qwin, Leica Imaging Systems, Cambridge, Großbritannien) planimetrisch ermittelt. Die Plaquegröße wurde als prozentualer Anteil der Plaquefläche an der gemessenen Gesamtfläche des Aortenbogens bestimmt.

II.9 Bestimmung von Lipidparametern und ACE-Aktivität

Die quantitative Bestimmung von Gesamtcholesterin, HDL-/LDL-Fraktionen, Triglyceriden und ACE-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines klinisch-chemischen Analyseautomaten (Hitachi Typ 912 Automatic Analyzer, Roche Diagnostics, Mannheim). Dazu wurde das Serum unter Verwendung unterschiedlicher enzymatischer Tests im Automaten photometrisch untersucht.

II.9.1 Cholesterinbestimmung

Nach Zugabe des Cholesterinreagenz (Firma Roche, Mannheim) zum Serum werden die Cholesterinester unter Einwirkung der Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Das Cholesterin wird von Sauerstoff unter Mitwirkung von Cholesterinoxidase zu Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid um-

gesetzt. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminophenazon und Phenol unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen roten Farbstoff, dessen Farbintensität der Cholesterinkonzentration direkt proportional ist und photometrisch gemessen werden kann.

II.9.2 HDL-Cholesterinbestimmung

Nach Zugabe von α -Cyclodextrinsulfat/Puffer-Reagenz (Firma Roche, Mannheim) bildet α -Cyclodextrinsulfat und Dextransulfat in Gegenwart von Magnesiumsulfat selektiv wasserlösliche Komplexe mit LDL, VLDL und Chylomikronen, die widerstandsfähig gegen PEG-modifizierte Enzyme sind. Anschließend wird PEG-modifizierte Enzyme/4-Aminophenazon/Puffer-Reagenz zugesetzt und die HDL-Cholesterinester werden unter Einwirkung der Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Das Cholesterin wird von Sauerstoff unter Mitwirkung von Cholesterinoxidase zu Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminophenazon und HSDA unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen violettblauen Farbstoff, dessen Farbintensität, direkt proportional der HDL-Cholesterinkonzentration, photometrisch gemessen wird.

II.9.3 LDL-Cholesterinbestimmung

Durch Zugabe eines homogenen, enzymatischen Farbtests (Firma Roche, Mannheim) werden VLDL und Chylomikronen selektiv inhibiert. Ein zweites Detergenz führt zur selektiven Micellenbildung von HDL, VLDL und Chylomikronen. Die LDL-Cholesterinester werden unter Einwirkung von Cholinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Das Cholesterin wird von Sauerstoff unter Mitwirkung von Cholesterinoxidase zu Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminoantipyrin und HSDA unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen violetten Farbstoff, dessen Farbintensität, direkt proportional der LDL-Cholesterinkonzentration, photometrisch gemessen wird.

II.9.4 Triglyceridbestimmung

Durch Zugabe von Puffer/4-Chlorphenol/Enzyme-Reagenz (Firma Roche, Mannheim) werden die Triglyceride unter Einwirkung der Lipoproteinlipase in Glycerin und Fettsäuren gespalten. Das Glycerin wird über Glycerin-3-phosphat unter Einwirkung der Glycerin-3-phosphatoxidase zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid umgesetzt, welches unter katalytischer Wirkung der Peroxidase mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol einen roten Farbstoff bildet. Dieser besitzt eine der Triglyceridkonzentration direkt proportionale Farbintensität und wird photometrisch gemessen.

II.9.5 ACE-Aktivitätsbestimmung

Durch Zugabe von Tripeptidsubstrat N-[3-(2-furyl)acryloyl]-L-Phenylalanyl-Glycyl-Glycin (FAPGG) (Firma Sigma, Deisenhofen) wirkt ACE als Katalysator. FAPGG wird zu Furylacryloyl-Phenylalanin (FAP) und Glycin-Glycin (GG) gespalten. Der hydrolytische Abbau von FAPGG führt zu einer Absorptionsabnahme bei 340 nm. Im spektralphotometrischen Verfahren wird die ACE-Aktivität in der Probe durch den Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeit der Probe mit der des ACE-Kalibrators ermittelt.

II.10 Bestimmung von Endothelin und von-Willebrand-Faktor

II.10.1 Big-Endothelinbestimmung

Mit einem Enzymimmunoassay (Biomedica, Big ET 1-38 Elisa) wird Big Endothelin direkt aus dem EDTA-Plasma bestimmt.

Big Endothelin ist die biologische Vorstufe des Endothelins und wird in diesem Assay bestimmt, da Endothelin eine Halbwertszeit von weniger als einer Minute aufweist. Big Endothelin hingegen wird erst nach einer Stunde auf die Hälfte seiner Konzentration abgebaut.

Dieser für Big Endothelin spezifische Sandwich-Elisa verwendet einen auf Mikrotiterplatten beschichteten immunaffinitätschromatographisch gereinigten polyclonalen Erstantikörper. Ein monoklonaler Zweitantikörper bildet mit dem in der Probe vorhandenen Big Endothelin und dem gebundenem Erstantikörper einen Sandwich. Nach einem Waschschriff, der alle nicht spezifisch gebundenen Substanzen entfernt, wird die Menge an gebundenem monoklonalem Antikörper bestimmt. Sie entspricht der Menge des in

der Probe vorhandenen Big Endothelins. Zur Detektion wird ein mit Peroxidase konjugierter anti-Maus Antikörper eingesetzt. Nach abermaligem Waschen wird Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat zugegeben. Die in einem Elisa-Photometer messbare Farbwirkung ist direkt proportional der Konzentration an Big Endothelin in der Probe.

II.10.2 Von-Willebrand -Faktor-Bestimmung

Der von-Willebrand-Faktor wird ebenfalls mit einem Enzymimmunoassay (Imubind vWF ELISA Kit, American Diagnostica Inc.) bestimmt. Der Ablauf erfolgt wie in der oben beschriebenen Art und Weise. Allerdings wird bei diesem Sandwich Elisa zur Detektion ein mit Peroxidase konjugierter anti-Ziege Antikörper verwendet.

II.11 Nachweis der NO/O_2^- - Freisetzung

Die Stickstoffmonoxid (NO)-Bestimmung wurde mit Hilfe eines Porphyrin-Mikrosensors durchgeführt. Dieser arbeitet bei einer konstanten Spannung von 0,68 Volt gegen eine gesättigte Kalomel-Elektrode und registriert die Stromstärke, die proportional zur NO-Konzentration ist. Die NO-Freisetzung einer einzelnen Zelle konnte somit innerhalb von 10 ms gemessen werden.

Die thorakalen Aortenstreifen wurden für die Messung der Stickstoffmonoxid- und Superoxidfreesetzung aus den Endothelzellen in einer physiologischen Lösung unter dem Mikroskop plaziert. Der Porphyrin-Mikrosensor wurde mit einem sterotaktischen Mikro-manipulator an die Oberfläche der Blutgefäße herangeführt, was

über ein piezoelektrisches Signal angezeigt wurde. Zwei Hilfselektroden wurden neben den Aortenstreifen positioniert.

Für die Superoxid-Bestimmung wurde zusätzlich ein Mikrosensor, der speziell für die Ein-Zellmessung modifiziert worden war, verwendet. Dieser befand sich während der Untersuchung ebenfalls nahe der Endothelfläche. Nach Zugabe eines Kalzium-Ionophors konnte so die Freisetzung von NO und O_2^- aus den Endothelzellen gemessen werden (Jung et al., 2000).

II.12 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes SigmaStat® 2.03 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Wenn mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Lilliefors Korrektur auf einem Signifikanzniveau von 5 % keine Abweichungen von der Normalverteilung festgestellt wurden, wurden anschließend die Gruppen nach Feststellung der gleichen Varianz (Levene Median Test) mit multiplen t-Tests, nach Bonferroni adjustiert, miteinander verglichen. Waren die Daten nicht normalverteilt, wurden nach Anwendung eines Krusal-Wallis-Testes paarweise Einzelvergleiche nach der Dunn's Methode durchgeführt.

Die Tests wurden auf einem multiplen Signifikanzniveau von 5 % pro Parameter durchgeführt. War der Versuchsablauf so gestaltet, dass aufgrund der Gabe verschiedener Substanzkonzentrationen pro Gruppe mehrere Ergebnisse zu beurteilen waren, wurden zur Auswertung die Differenzen zum basalen Vorwert herangezogen. Dazu zählen die Untersuchungen der Aortenrelaxation nach Acetylcholin- und Natriumnitroprussidgabe in vier aufsteigenden

Konzentrationen. Mit paarweisen Einzelvergleichen im Rank Sum Test wurden zunächst die Werte der höchsten Dosierungen getestet und bei positivem Ergebnis mit der nächstniedrigeren fortgefahren.

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm mittlere Standardabweichung ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) angegeben und $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

III Ergebnisse

III.1 Ergebnisse der Blutdruck- und Herzfrequenzmessung

III.1.1 Basale Blutdruckwerte und Herzfrequenzen

Bei der Blutdruckmessung in der A. carotis communis ergaben sich folgende Werte (in mm Hg; $\bar{x} \pm \text{SEM}$): Standardfutter mittlerer Blutdruck (BD) 73 ± 3 ; atherogene Diät 73 ± 5 ; variierte Diät $73,1 \pm 2$; variierte Diät + Ramipril 56 ± 3 ; variierte Diät + AVE 7688 48 ± 1 .

Die Gruppe variierte Diät + AVE 7688 unterscheidet sich signifikant von der Gruppe variierte Diät, atherogene Diät und Standard.

Der mittlere Blutdruck ist in Abb.5 graphisch dargestellt.

Gleichzeitig wurde bei der Standard-gefütterten Gruppe eine Herzfrequenz (HR) von 238 ± 13 , bei der atherogen gefütterten Gruppe von 208 ± 11 , bei der variiert gefütterten Gruppe von 241 ± 22 , bei der variiert gefütterten Gruppe + Ramipril von 209 ± 7 und bei der variiert gefütterten Gruppe + AVE 7688 von 230 ± 11 gemessen.

Zwischen den Gruppen war kein signifikanter Unterschied der Herzfrequenz festzustellen.

Die Herzfrequenz ist in Abb.6 graphisch dargestellt.

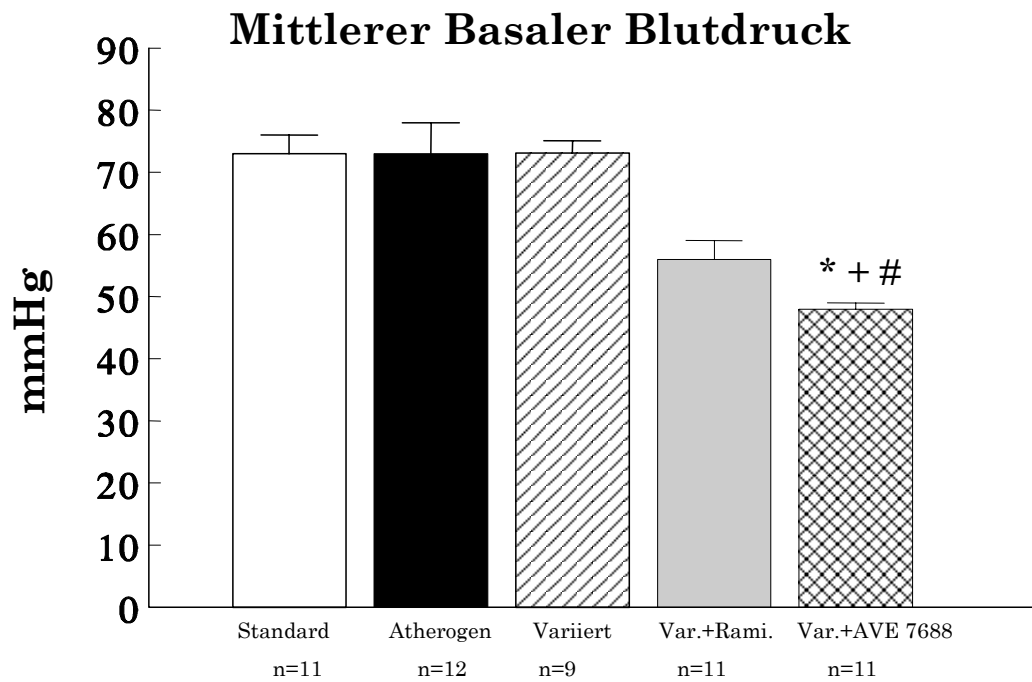


Abb.5 : Mittlerer basaler Blutdruck (Angaben in mmHg; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).
 (*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät; +: $p < 0,05$ vs. Atherogen;
 #: $p < 0,05$ vs. Standard)

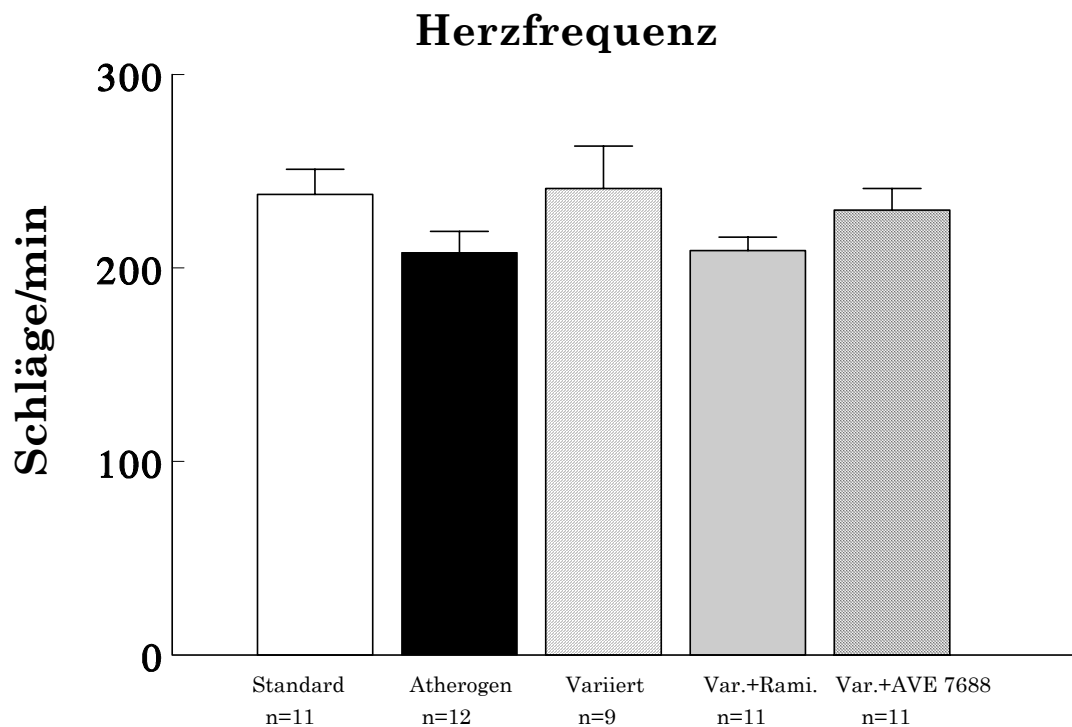


Abb.6 : Herzfrequenz (Angaben in Schläge/min; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

III.1.2 Blutdruckwerte nach Angiotensin I- und Bradykinin-Gabe

Nach der Verabreichung von Angiotensin I (130 ng/kg) steigt der Blutdruck in den einzelnen Gruppen folgendermaßen an (Blutdruckänderungen in %; $\bar{x} \pm \text{SEM}$): Standard-gefütterte Gruppe $15,4 \pm 2,2$; atherogen gefütterte Gruppe $21,9 \pm 4,1$; variiert gefütterte Gruppe $19,8 \pm 2,7$; variiert gefütterte Gruppe + Ramipril $4,5 \pm 1$; variiert gefütterte Gruppe + AVE 7688 $4,0 \pm 1,7$. Die Gruppen variiert gefütterte + Ramipril und AVE 7688 unterscheiden sich hinsichtlich des Blutdruckanstiegs signifikant von den anderen drei Gruppen.

Der Anstieg des Blutdrucks ist in Abb.7 graphisch dargestellt, wobei die Veränderungen abhängig vom basalen Vorwert in Prozent angegeben werden.

Nach der Verabreichung von Bradykinin (250 ng/kg) sinkt der Blutdruck in den einzelnen Gruppen folgendermaßen ab (Blutdruckänderungen in %; $\bar{x} \pm \text{SEM}$): Standard-gefütterte Gruppe $-41,1 \pm 1,1$; atherogen gefütterte Gruppe $-30,9 \pm 1,5$; variiert gefütterte Gruppe $-33,3 \pm 3,4$; variiert gefütterte Gruppe + Ramipril $-52,8 \pm 2,1$; variiert gefütterte Gruppe + AVE 7688 $-50,3 \pm 2,8$. Die Gruppen variiert gefütterte + Ramipril und AVE 7688 unterscheiden sich hinsichtlich des Blutdruckabfalls signifikant von den anderen drei Gruppen. Außerdem zeigt die atherogen gefütterte Gruppe einen signifikanten Unterschied zur Standard-gefütterten Gruppe.

Der Abfall des Blutdruckes ist in Abb.8 graphisch dargestellt, wobei ebenfalls die Veränderungen in Abhängigkeit vom basalen Blutdruck in Prozent angegeben werden.

Blutdruckanstieg nach Angiotensin I

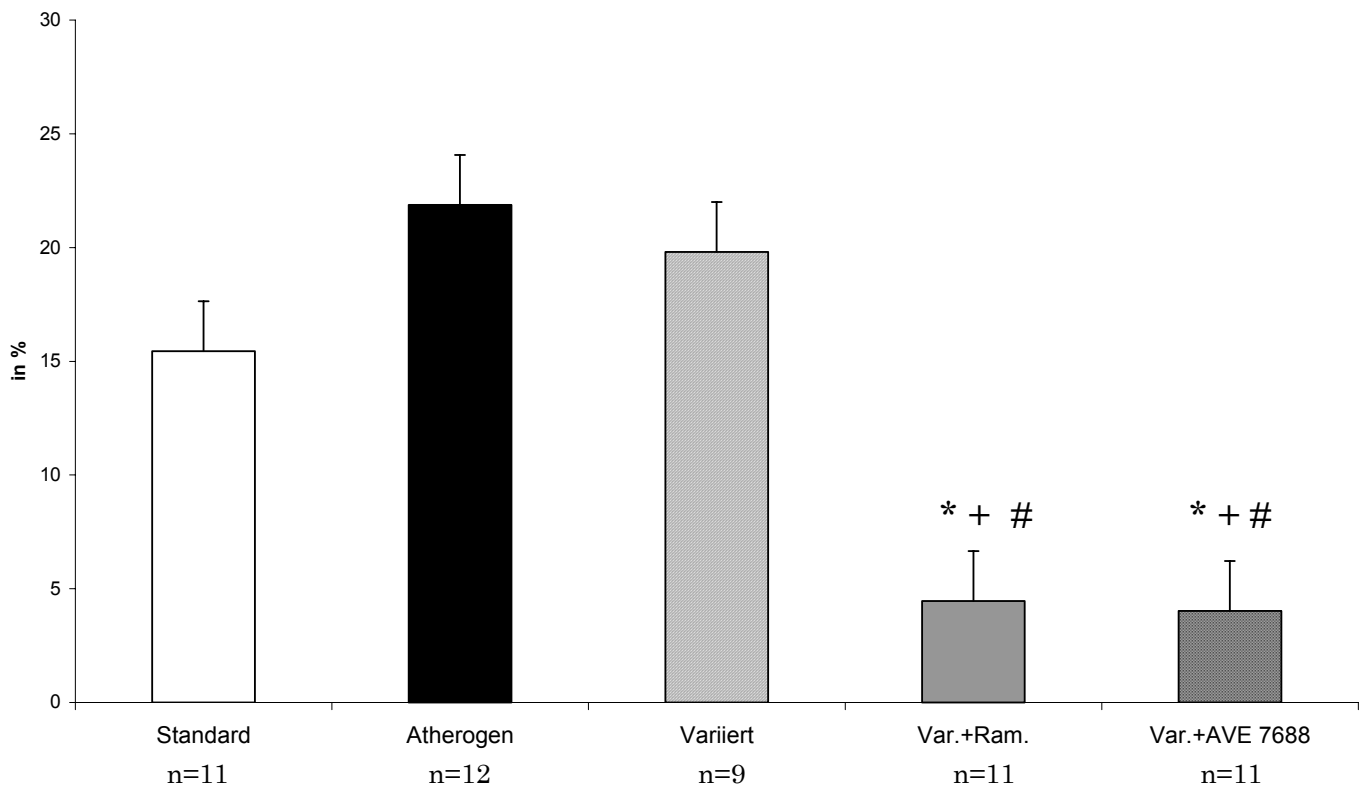


Abb.7 : Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks unter Angiotensin I (130 ng/kg) in Abhängigkeit vom basalen Blutdruck (Angaben in %, $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät; +: $p < 0,05$ vs. Atherogen; #: $p < 0,05$ vs. Standard)

Blutdruckabfall nach Bradykinin

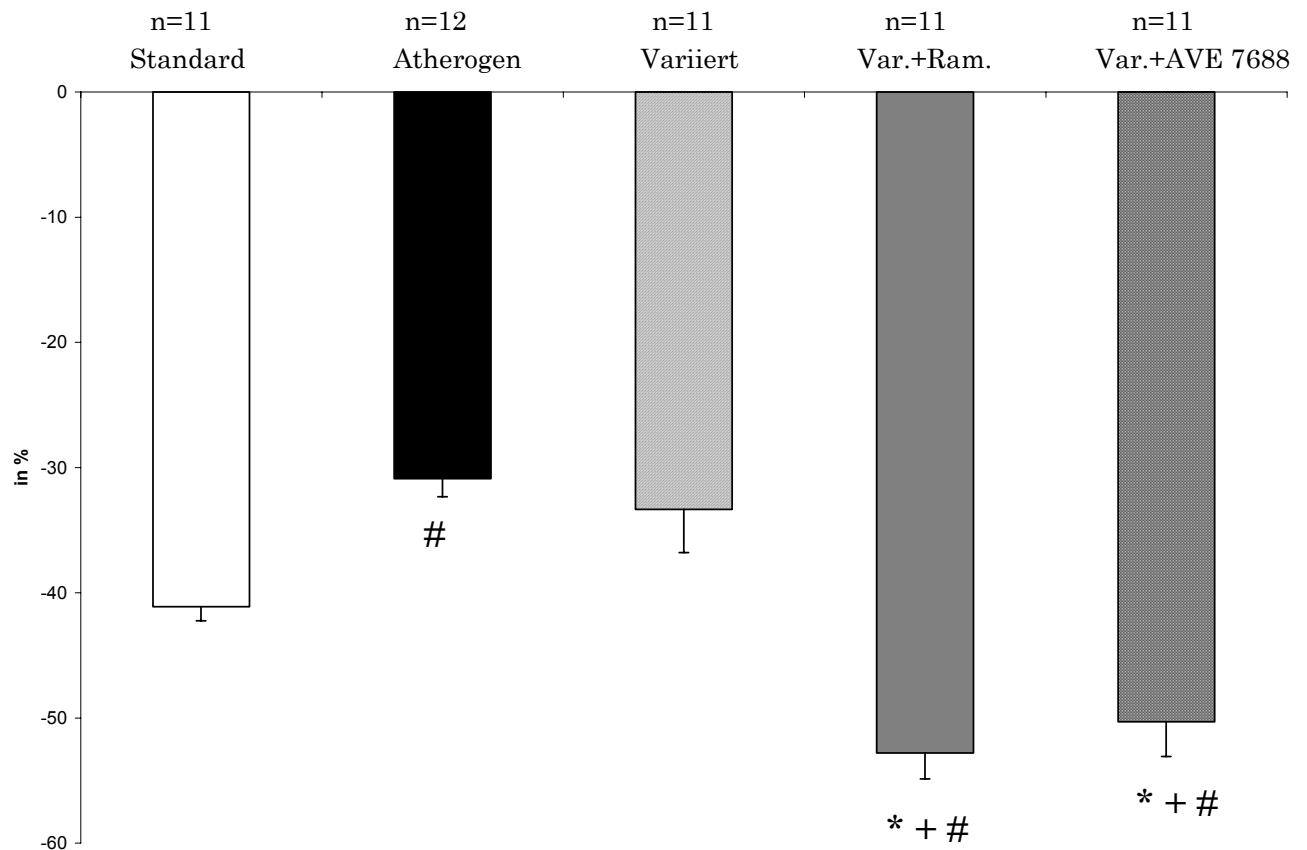


Abb.8 : Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks unter Bradykinin (250 ng/kg) in Abhängigkeit vom basalen Blutdruck (Angaben in %, $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät; +: $p < 0,05$ vs. Atherogen; #: $p < 0,05$ vs. Standard)

III.2 Ergebnisse der Messung der isolierten Aorten

III.2.1 *Ergebnisse der Aortenkontraktionen*

Bei der 1. Kontraktion mit Phenylephrin (100 nM) wurden folgende Werte ermittelt (in g; $\bar{x} \pm \text{SEM}$): Standardfutter $4,36 \pm 0,16$; atherogene Diät $3,51 \pm 0,12$; variierte Diät $3,73 \pm 0,09$; variierte Diät + Ramipril $4,28 \pm 0,13$; variierte Diät + AVE 7688 $4,19 \pm 0,16$.

Die Standard-gefütterte Gruppe und die variiert gefütterte Gruppe + Ramipril unterscheiden sich jeweils signifikant von der atherogen-gefütterten Gruppe und der variiert gefütterten Gruppe.

Die variiert gefütterte Gruppe + AVE 7688 zeigt einen signifikanten Unterschied nur bezüglich der atherogen gefütterten Gruppe.

Die folgenden Werte ergaben sich bei der 2. Kontraktion mit Phenylephrin (100 nM) (in g; $\bar{x} \pm \text{SEM}$): Standardfutter $5,01 \pm 0,20$; atherogene Diät $3,62 \pm 0,16$; variierte Diät $4,33 \pm 0,12$; variierte Diät + Ramipril $5,02 \pm 0,15$; variierte Diät + AVE 7688 $4,75 \pm 0,14$.

Die Standard-gefütterte Gruppe und die variiert gefütterte Gruppe + Ramipril unterscheiden sich wieder jeweils signifikant von der atherogen gefütterten Gruppe und der variiert gefütterten Gruppe.

Auch die variiert gefütterte Gruppe + AVE 7688 zeigt wiederum einen signifikanten Unterschied bezüglich der atherogen gefütterten Gruppe. Zusätzlich unterscheidet sich nun auch die variiert gefütterte Gruppe von der atherogen gefütterten Gruppe signifikant.

Die beiden Phenylephrinkontraktionen sind in Abb.9 a+b graphisch dargestellt.

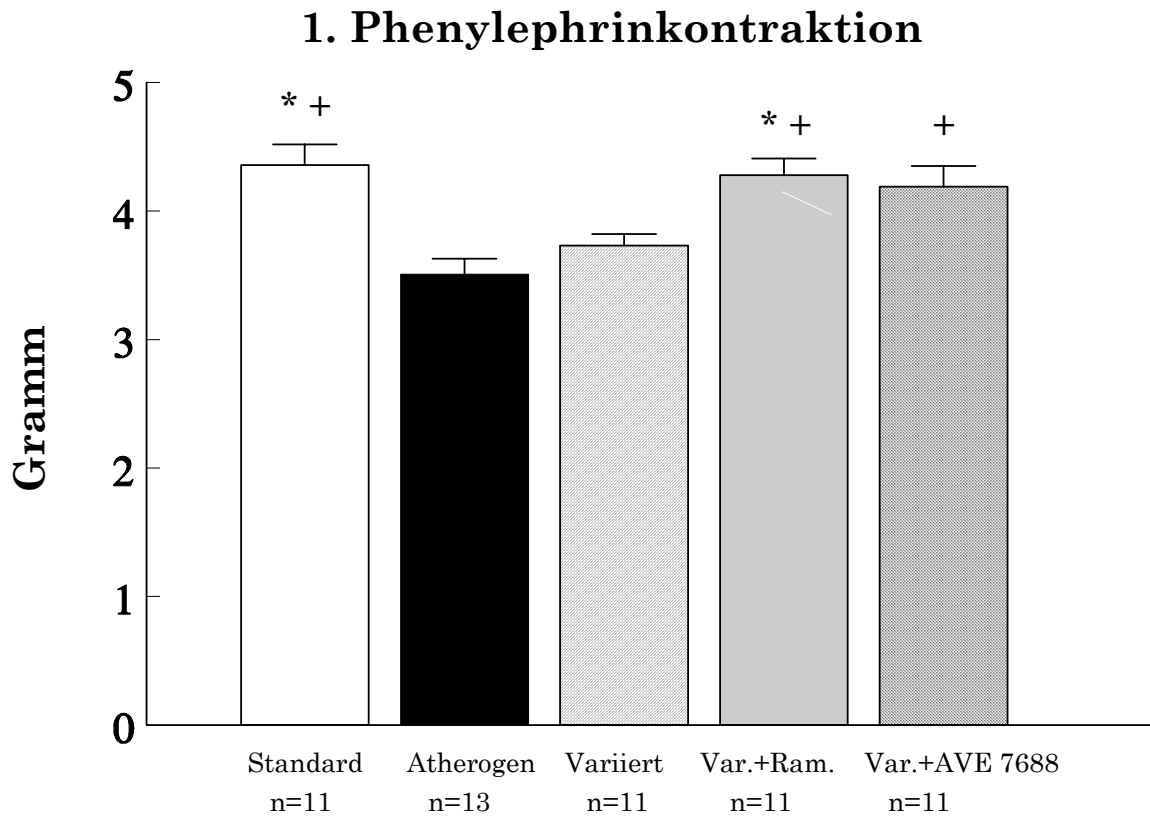


Abb.9a : 1. Kontraktion nach Gabe von Phenylephrin (100 nM) (Angaben in g; $x \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät; +: $p < 0,05$ vs. Atherogen)

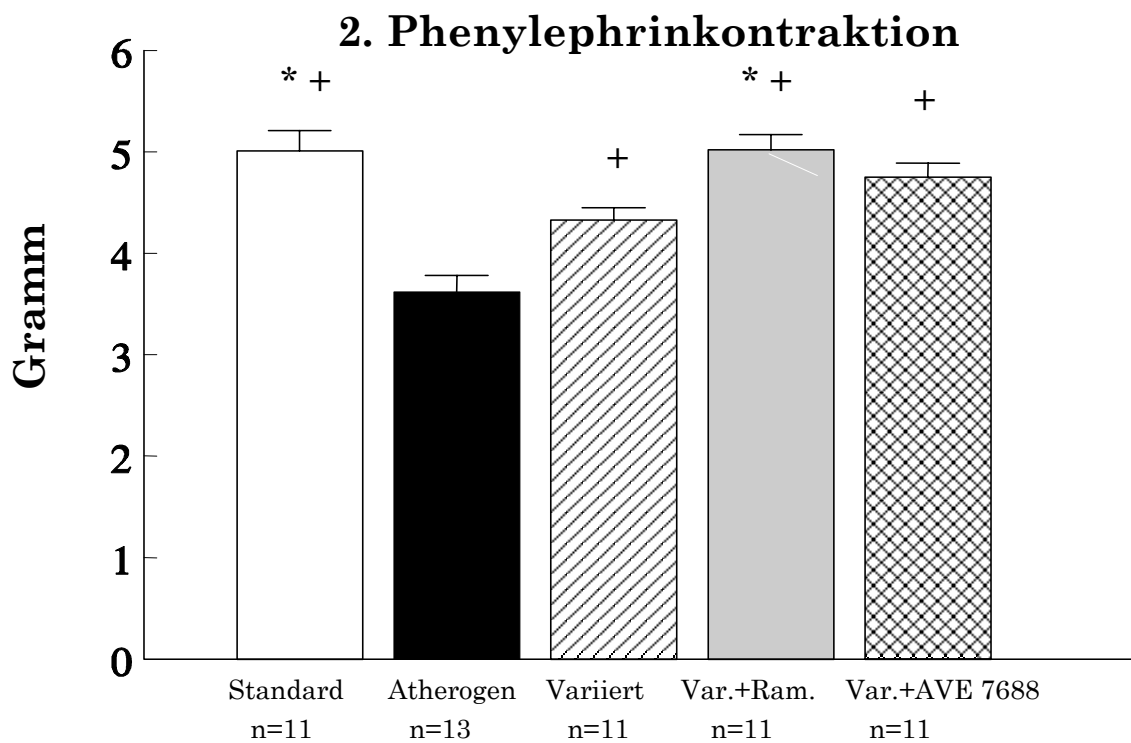


Abb.9b : 2. Kontraktion nach Gabe von Phenylephrin (100 nM) (Angaben in g; $x \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät; +: $p < 0,05$ vs. Atherogen)

Nach der Gabe von Ang I (1 μ M) kontrahierten die Aortenstreifen um folgende Werte (in %; $\bar{x} \pm \text{SEM}$): Standardfutter $47,13 \pm 6,36$; atherogene Diät $118,84 \pm 12,69$; variierte Diät $65,07 \pm 5,51$; variierte Diät + Ramipril $35,57 \pm 4,79$; variierte Diät + AVE 7688 $33,35 \pm 5,67$.

Die variiert gefütterte Gruppe, sowie die atherogen gefütterte Gruppe unterscheiden sich statistisch signifikant von der variiert gefütterten Gruppe + Ramipril und der variiert gefütterten Gruppe + AVE 7688.

Die atherogen gefütterte Gruppe unterscheidet sich zusätzlich noch statistisch signifikant von der Standard-gefütterten Gruppe.

Die Kontraktion der Aorten auf Ang I (1 μ M) ist in Abb.10 graphisch dargestellt, wobei die Veränderungen in Abhängigkeit zur 2. Phenylephrinkontraktion in Prozent angegeben werden.

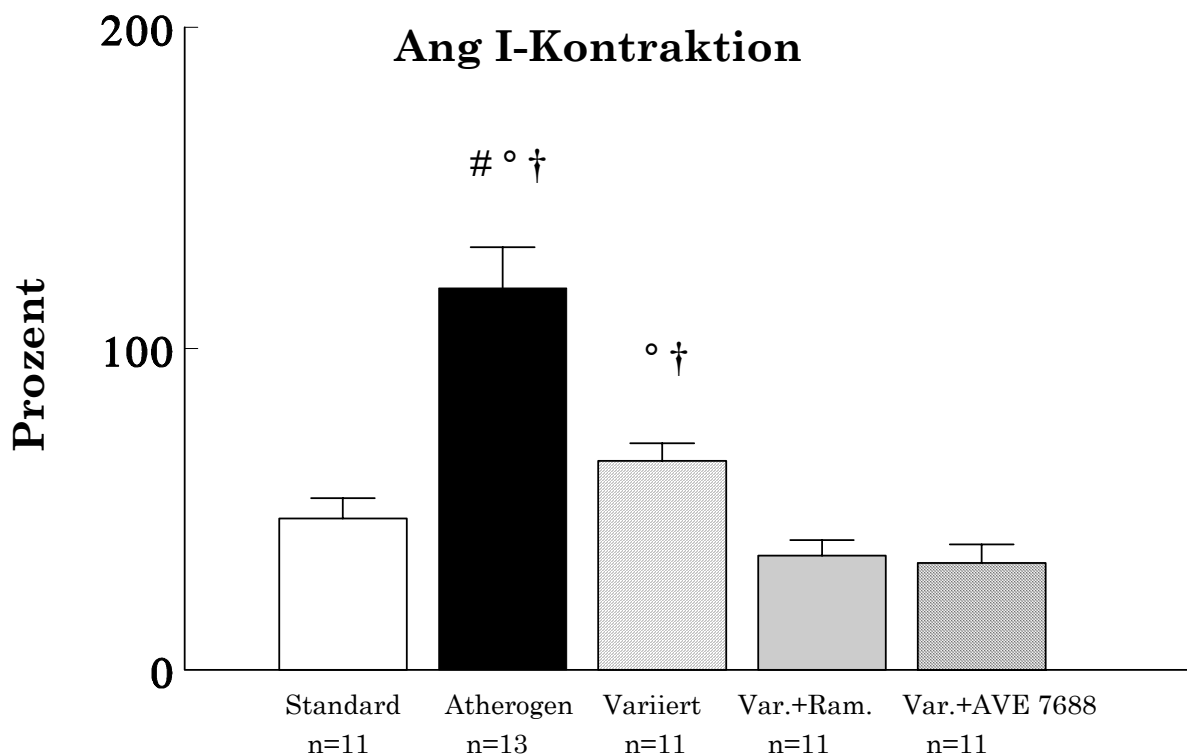


Abb.10 : Kontraktion nach Gabe von Ang I (1 μ M) (Angaben in %; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).
 (#: $p < 0,05$ vs. Standard; °: $p < 0,05$ vs. Var.+ Ram.; †: $p < 0,05$ vs. Var.+ AVE 7688)

III.2.2 Ergebnisse der Aortenrelaxationen

Die erhaltenen Mittelwerte und ihre mittleren Standardabweichungen für die Relaxation der Aortenstreifen durch Zugabe von Acetylcholin (ACh) und Natriumnitroprussid (SNP) in jeweils vier steigenden Konzentrationen sind tabellarisch (Tab.3 und 4) und graphisch (Abb.11 und 12) dargestellt.

Bei der Relaxation durch Acetylcholin nach Phenylephrin-Kontraktion ist die atherogen gefütterte Gruppe in den Konzentrationen 10^{-5} – 10^{-7} gegen die anderen vier Gruppen statistisch signifikant.

Gegen die variiert gefütterte Gruppe sind in den Dosierungen 10^{-5} und 10^{-6} die variiert gefütterte Gruppe + Ramipril und die variiert-gefütterte Gruppe + AVE 7688 sowie die Standard-gefütterte Gruppe statistisch signifikant.

Bei einer Konzentration von 10^{-7} zeigt nur noch die variiert gefütterte Gruppe + AVE 7688 einen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der variiert gefütterte Gruppe.

Die Relaxationen mit SNP ergeben keine statistisch signifikanten Unterschiede.

ACh	10 ⁻⁸ mol/L	10 ⁻⁷ mol/L	10 ⁻⁶ mol/L	10 ⁻⁵ mol/L
Gruppen				
Standard	11,65 ± 1,55	52,68 ± 3,06	75,64 ± 2,83	83,81 ± 3,3
Atherogen	2,18 ± 1,23	7,07 ± 2,76	11,82 ± 3,88	12,49 ± 4,1
		* # ° †	* # ° †	* # ° †
Variiert	10,76 ± 2,29	43,33 ± 3,57	63,48 ± 2,89	69,41 ± 2,82
		†	† # °	† # °
Var. +Ram.	13,08 ± 2,22	51,86 ± 4,43	77,34 ± 3,7	83,73 ± 4,03
Var.+AVE	19,9 ± 3,48	59,62 ± 6,43	76,4 ± 6,38	80,89 ± 6,82
7688				

Tab.3 : Durchschnittliche Relaxation der Aortenstreifen durch Zugabe von Acetylcholin in vier steigenden Konzentrationen (10⁻⁸ mol/L, 10⁻⁷ mol/L, 10⁻⁶ mol/L und 10⁻⁵ mol/L) nach vorheriger Stimulation durch Phenylephrin (10⁻⁷ mol/L) (Angaben in %; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: p<0,05 vs. variierte Diät; #: p<0,05 vs. Standard; °: p<0,05 vs. Var.+ Ram. †: p<0,05 vs. Var.+ AVE 7688)

SNP Gruppen	10^{-8} mol/L	10^{-7} mol/L	10^{-6} mol/L	10^{-5} mol/L
Standard	$9,4 \pm 1,22$	$49,08 \pm 3,87$	$75,15 \pm 2,35$	$88,22 \pm 1,57$
Atherogen	$7,44 \pm 1,44$	$40 \pm 3,78$	$72,4 \pm 3,37$	$90,81 \pm 2,06$
Variiert	$9,8 \pm 1,42$	$38,4 \pm 3,34$	$70,1 \pm 2,88$	$86,5 \pm 1,69$
Var. +Ram.	$12,61 \pm 1,21$	$54,93 \pm 3,05$	$81,22 \pm 2,16$	$92,75 \pm 0,75$
Var.+AVE 7688	$11,15 \pm 1,61$	$53,91 \pm 5,05$	$82,56 \pm 2,52$	$93,95 \pm 1,20$

Tab.4 : Durchschnittliche Relaxation der Aortenstreifen durch Zugabe von Sodiumnitroprussid in vier steigenden Konzentrationen (10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L und 10^{-5} mol/L) nach vorheriger Stimulation durch Phenylephrin (10^{-7} mol/L) (Angaben in %; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

Relaxation durch Acetylcholin

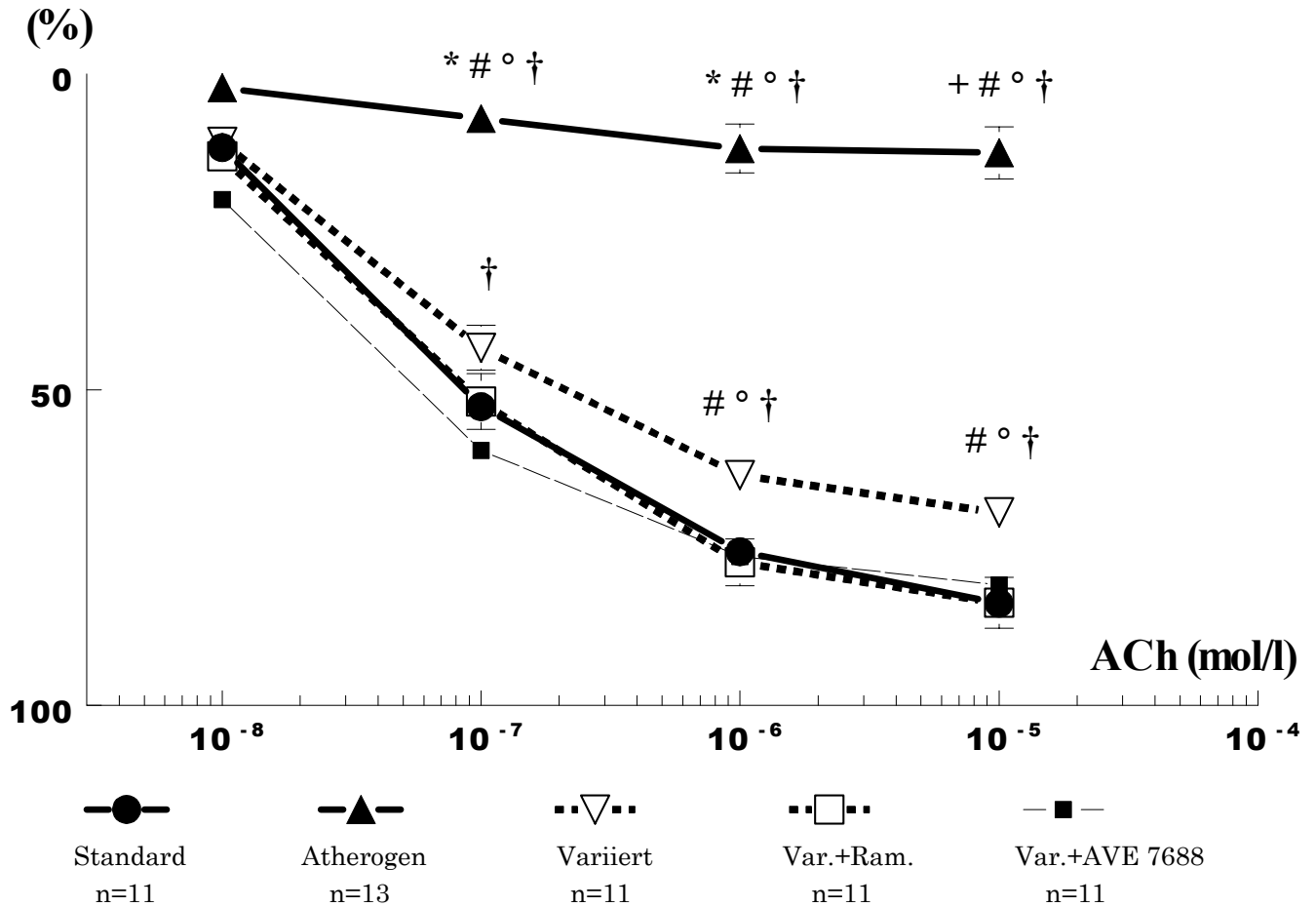


Abb.11 : Durchschnittliche Relaxation der Aortenstreifen durch Zugabe von Acetylcholin in vier steigenden Konzentrationen (10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L und 10^{-5} mol/L) nach vorheriger Stimulation durch Phenylephrin (10^{-7} mol/L) (Angaben in %; $\bar{x} \pm \text{SEM}$). (*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät; #: $p < 0,05$ vs. Standard; °: $p < 0,05$ vs. Var.+ Ram. †: $p < 0,05$ vs. Var.+ AVE 7688)

Relaxation durch Natriumnitroprussid

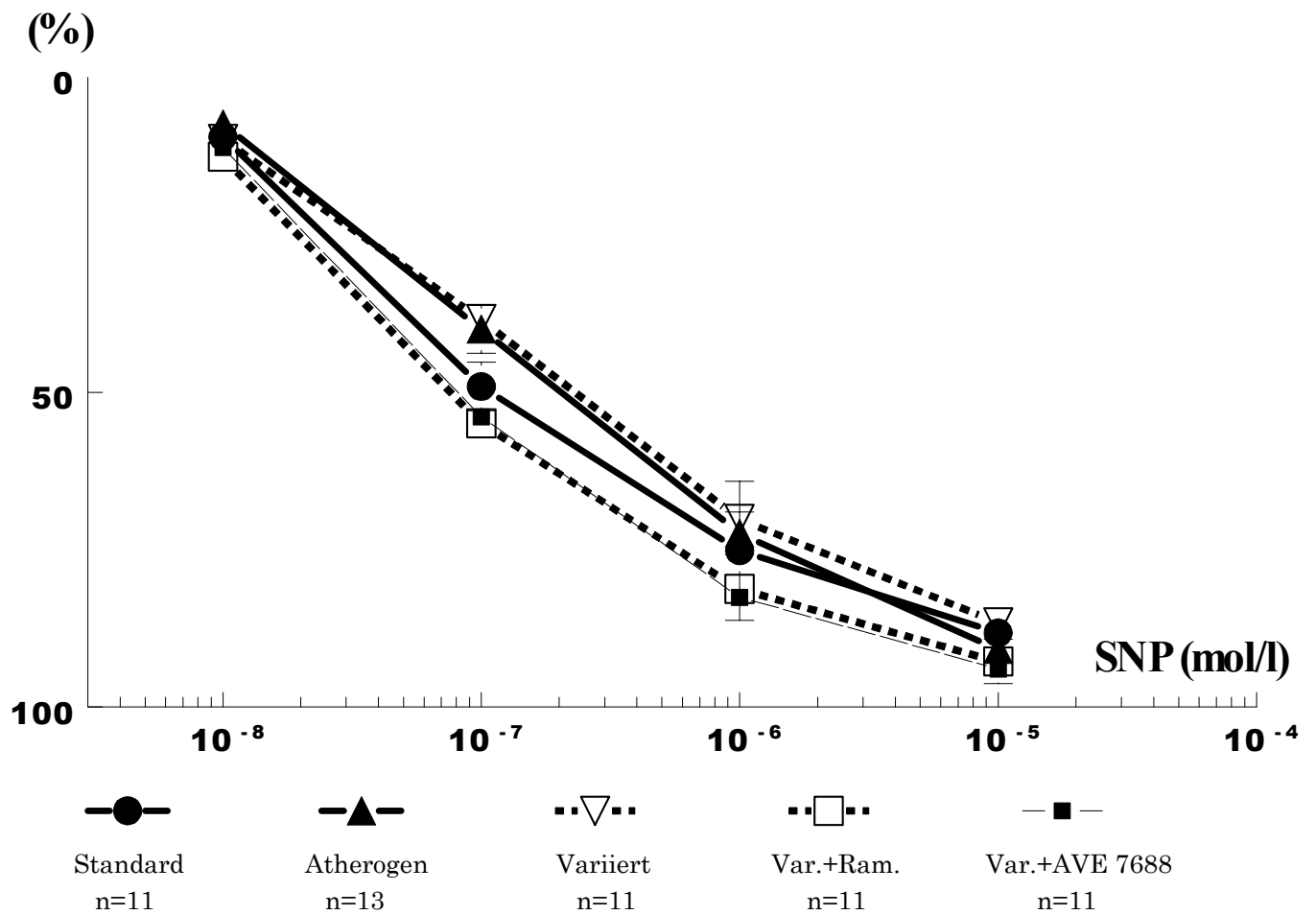


Abb.12 : Durchschnittliche Relaxation der Aortenstreifen durch Zugabe von Natriumnitroprussid in vier steigenden Konzentrationen (10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L und 10^{-5} mol/L) nach vorheriger Stimulation durch Phenylephrin (10^{-7} mol/L) (Angaben in %; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

III.3 Nachweis der Stickstoffmonoxidfreisetzung

Die Ergebnisse der Messungen von Stickstoffmonoxidfreisetzung im Aortenendothel sind folgende (nmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$): Standard-gefütterte Gruppe $306,71 \pm 36,16$; atherogen gefütterte Gruppe $167,77 \pm 30,65$; variiert gefütterte Gruppe $174,39 \pm 25,44$; variiert gefütterte Gruppe + Ramipril $368,31 \pm 42,25$ und variiert gefütterte Gruppe + AVE 7688 $329,19 \pm 30,10$.

Die Freisetzung von NO war in der Standard-gefütterten, in der variiert gefütterten + Ramipril und in der variiert gefütterten + AVE 7688 Gruppe jeweils statistisch signifikant gegenüber der atherogen-gefütterten und der variiert gefütterten Gruppe.

Die NO-Freisetzungen der einzelnen Gruppen sind in Abb.13 graphisch dargestellt.

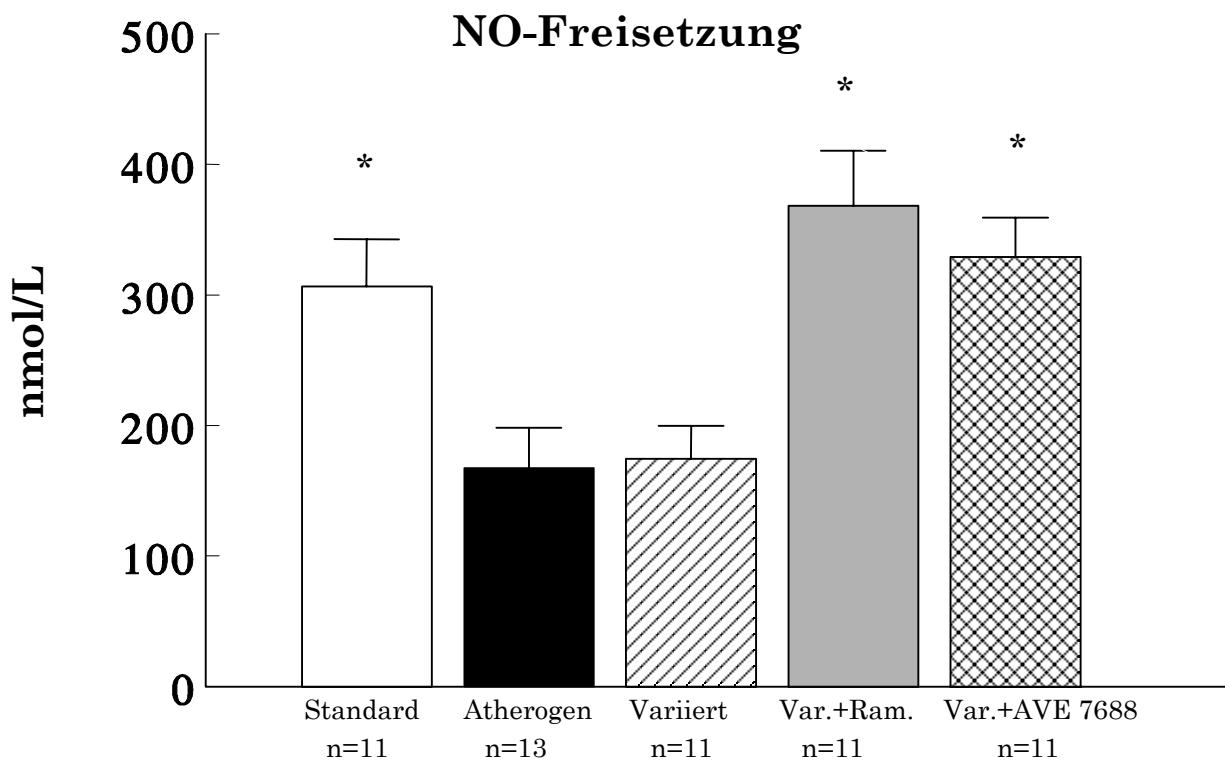


Abb.13 : NO-Freisetzung (Angaben in nmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät, vs. atherogene Diät.)

III.4 Nachweis der Superoxidfreisetzung

Die Ergebnisse für die Messung von Superoxidfreisetzung (nmol/L) im Aortenendothel sind für die verschiedenen Gruppen in Tab.5 angegeben.

Sowohl die atherogen gefütterte Gruppe als auch die variiert-gefütterte Gruppe + Ramipril unterscheiden sich jeweils statistisch signifikant von der Standard-gefütterten, der variiert gefütterten und der variiert gefütterten Gruppe + AVE 7688 .

Gruppen	Superoxid-Freisetzung (nmol/L)
Standard	29,41 ± 5,89
Atherogen	52,12 ± 7,06 *
Variiert	35,86 ± 7,49
Variiert + Ramipril	48,09 ± 7,91 *
Variiert + AVE 7688	30,18 ± 6,00

Tab.5 : Superoxidfreisetzung (Angaben in nmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

(*: p<0,05 vs. variierte Diät, vs. Standard, vs. variierte Diät + AVE 7688)

III.5 Planimetrisch ermittelte Plaques im Aortenbogen

Die planimetrisch bestimmten Plaques betrugen in der Standard-gefütterten Gruppe (in % der Gesamtfläche des Aortenbogen; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) $0,61 \pm 0,24$; in der atherogen gefütterten Gruppe $94,57 \pm 1,2$; in der variiert gefütterten Gruppe $52,45 \pm 6,33$; in der variiert gefütterten Gruppe + Ramipril $16,18 \pm 6$ und in der variiert gefütterten Gruppe + AVE 7688 $29,99 \pm 7,67$.

Die Gruppe atherogene Diät zeigte eine statistische Signifikanz gegenüber der Gruppe mit Standardfutter, variiertes Diät + Ramipril und variiertes Diät + AVE 7688.

Weiterhin gab es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der variiert gefütterten und der Standard-gefütterten Gruppe.

Die planimetrisch bestimmten Plaques der einzelnen Gruppen sind in Abb.14 graphisch dargestellt.

Abb.15a+b zeigt Ausschnitte der Aortenbögen eines variiert-gefütterten Tieres im Vergleich zu einem variiert gefütterten + Ramipril Tieres mit angefärbten Plaques.

Plaque Aortenbogen

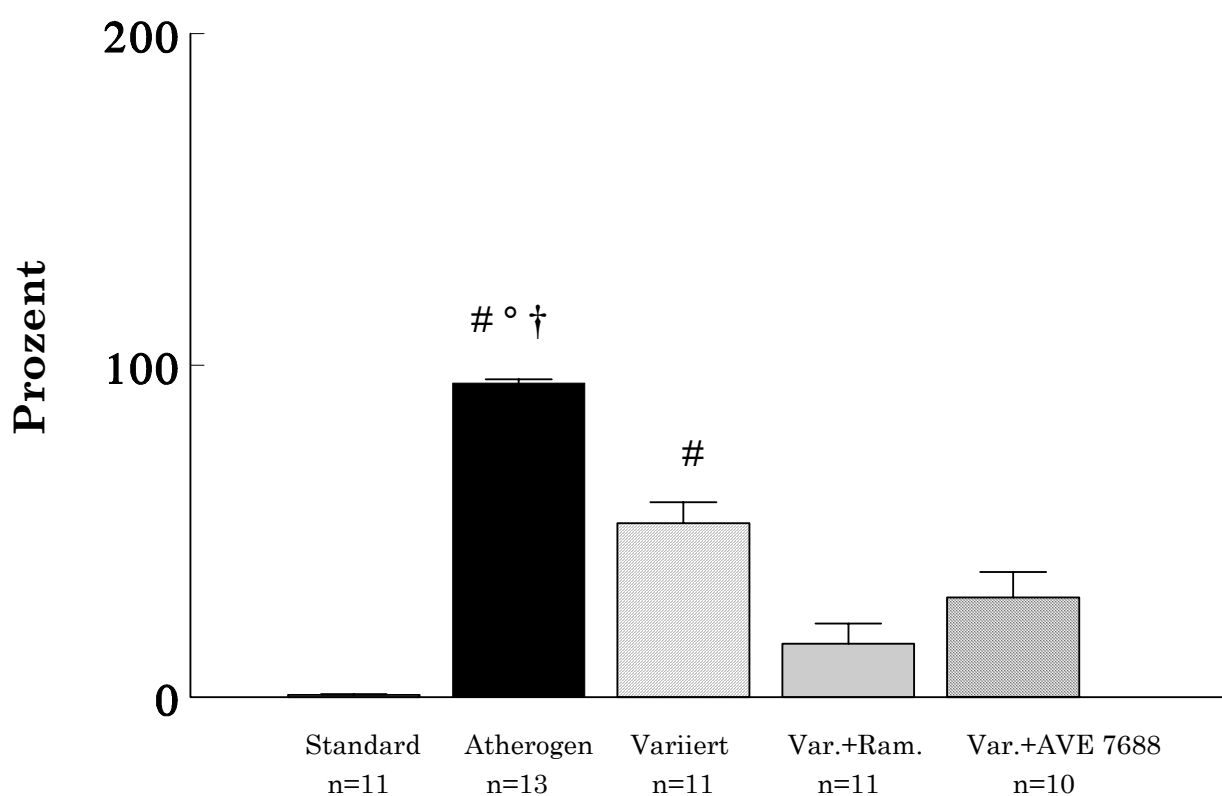


Abb.14 : Plaque im Aortenbogen (Angaben in %; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät; +: $p < 0,05$ vs. Atherogen; #: $p < 0,05$ vs. Standard; °: $p < 0,05$ vs. Var.+ Ram.; †: $p < 0,05$ vs. Var.+ AVE 7688)

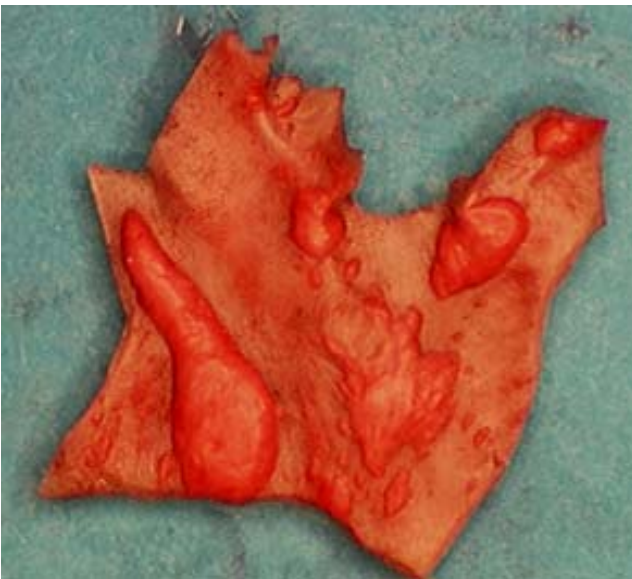


Abb.15a : Ausschnitt des Aortenbogens
eines variiert gefütterten Tieres
mit angefärbten Plaques

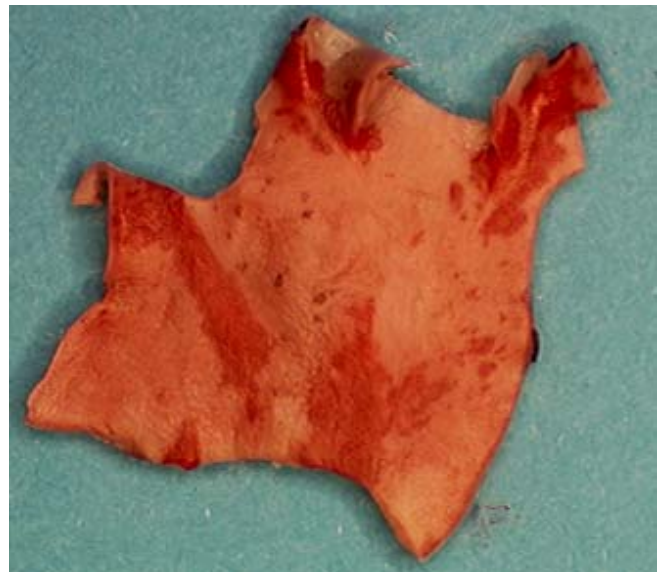


Abb.15b : Ausschnitt des Aortenbogens
eines variiert gefütterten + Ramipril
Tieres mit angefärbten Plaques

III.6 Ergebnisse der Bestimmung von Lipidparametern

III.6.1 *Ergebnisse der 1. Messung (6 Wochen)*

Die Lipidparameter (in folgender Reihenfolge: Gesamtcholesterin, Triglyceride, HDL und LDL) betrugen in der Standard-gefütterten Gruppe (in mmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) $0,8 \pm 0,07$; $1,18 \pm 0,12$; $0,49 \pm 0,05$; $0,15 \pm 0,03$; in der atherogen gefütterten Gruppe $18,1 \pm 2,04$; $1,31 \pm 0,25$; $2,87 \pm 0,16$; $17,24 \pm 1,97$; in der variiert gefütterten Gruppe $15,91 \pm 2,04$; $0,89 \pm 0,25$; $2,21 \pm 0,15$; $15,71 \pm 2,19$; in der variiert gefütterten Gruppe + Ramipril $12,71 \pm 1,61$; $1,06 \pm 0,23$; $2,71 \pm 0,13$; $12,52 \pm 1,7$ und in der variiert gefütterten Gruppe + AVE 7688 $12,74 \pm 1,41$; $1,31 \pm 0,22$; $2,87 \pm 0,17$; $12,33 \pm 1,45$.

Die Ergebnisse der 1. Bestimmung von Gesamtcholesterin, Triglyceride und der HDL-/LDL-Fraktionen aus dem Serum sind in Abb.16a-d graphisch dargestellt.

Hinsichtlich des Gesamtcholesterins und der HDL-/LDL-Fraktionen unterscheidet sich die Standard-gefütterte Gruppe statistisch signifikant von den übrigen vier Gruppen.

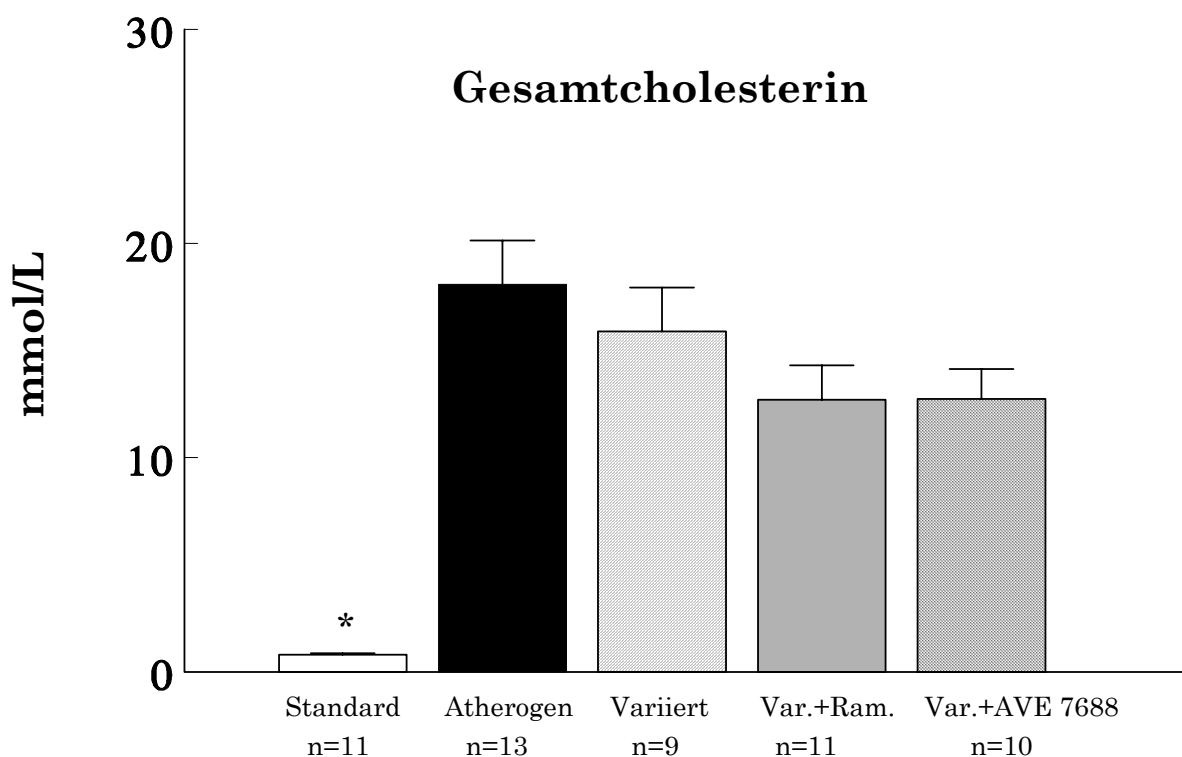


Abb.16a : Gesamtcholesterinspiegel (Angaben in mmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät, vs. Atherogene Diät, vs. Var.+ Ram., vs. Var.+ AVE 7688)

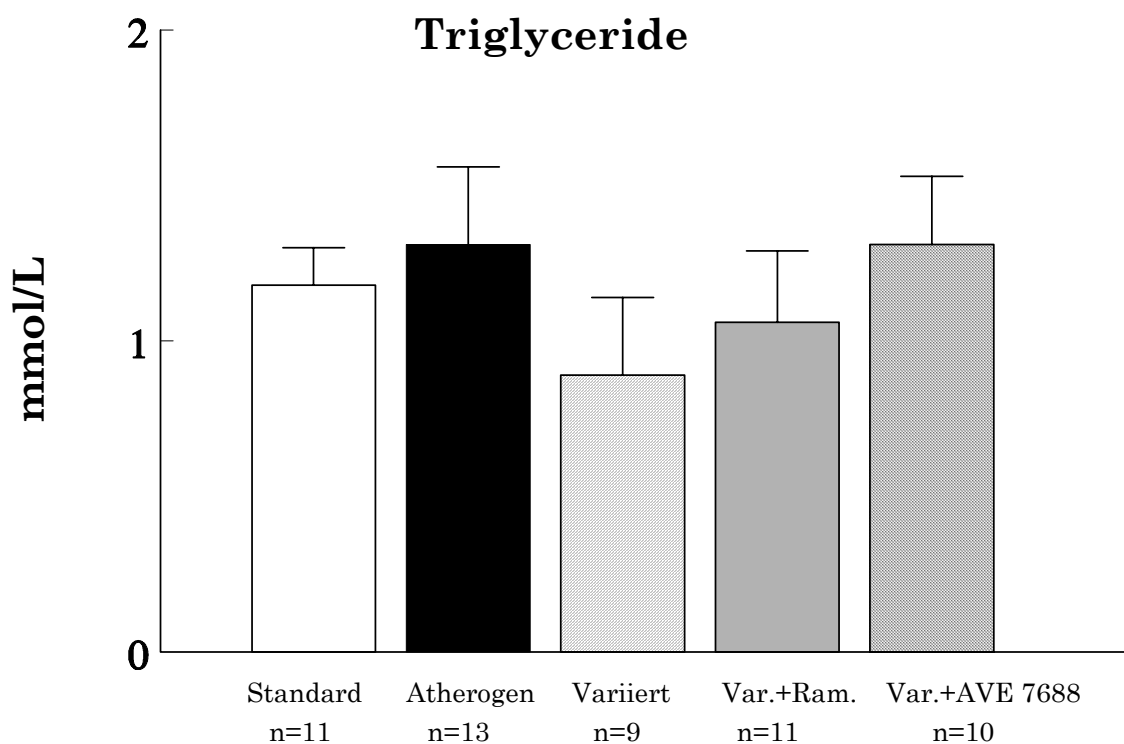


Abb.16b : Triglyceridspiegel (Angaben in mmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

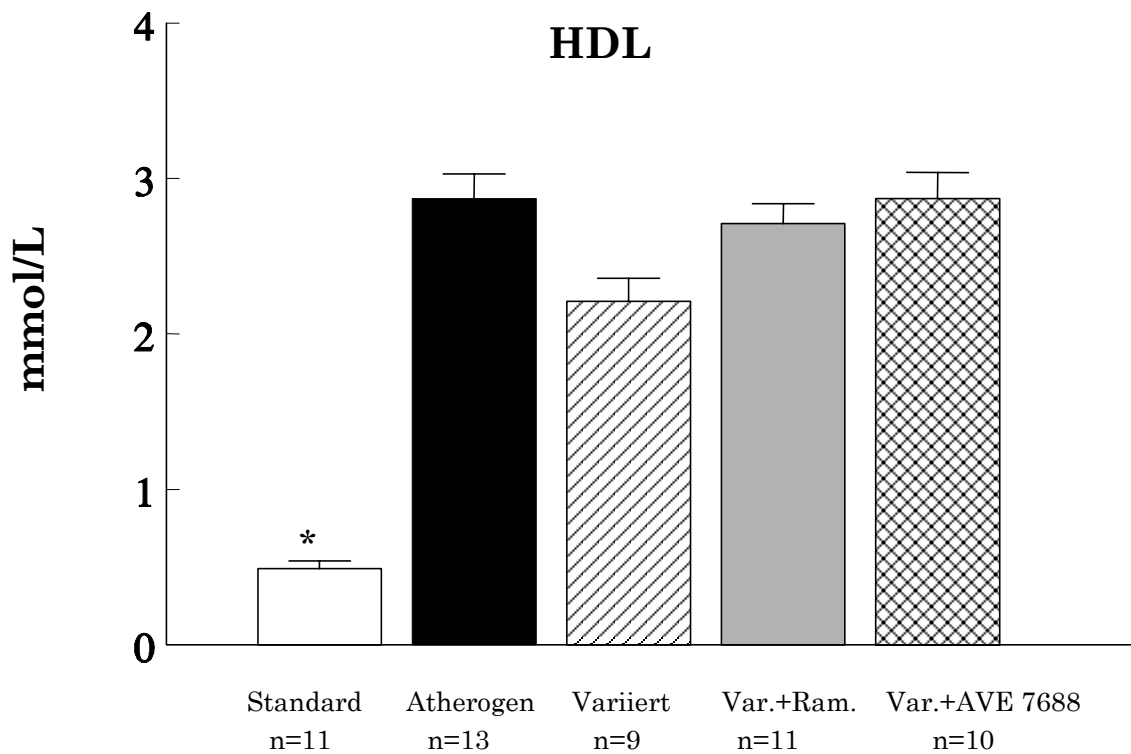


Abb.16c : HDL-Fraktion (Angaben in mmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät, vs. Atherogene Diät, vs. Var.+ Ram., vs. Var.+ AVE 7688)

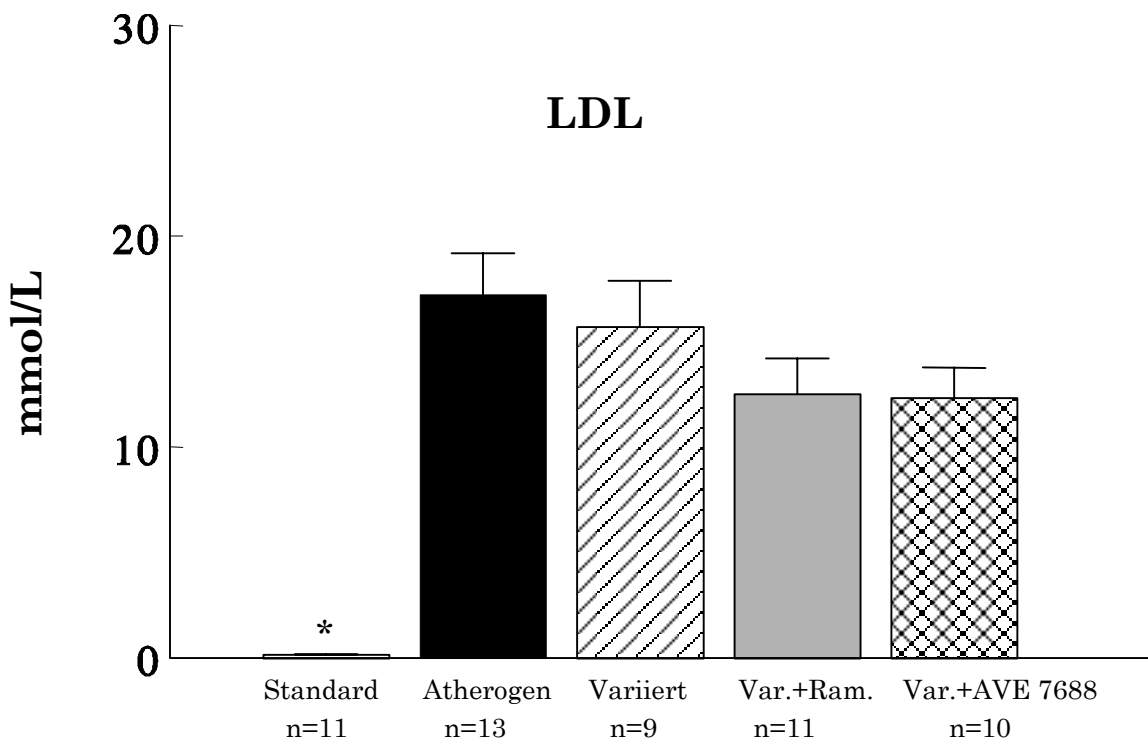


Abb.16d : LDL-Fraktion (Angaben in mmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät, vs. Atherogene Diät, vs. Var.+ Ram., vs. Var.+ AVE 7688)

III.6.2 Ergebnisse der 2. Messung (18 Wochen)

Die Lipidparameter (in folgender Reihenfolge: Gesamtcholesterin, Triglyceride, HDL und LDL) betrugen in der Standard-gefütterten Gruppe (in mmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) $0,55 \pm 0,05$; $1,10 \pm 0,3$; $0,32 \pm 0,03$; $0,11 \pm 0,01$; in der atherogen gefütterten Gruppe $33,3 \pm 3,34$; $1,52 \pm 0,28$; $0,32 \pm 0,03$; $0,11 \pm 0,01$; in der variiert gefütterten Gruppe $0,62 \pm 0,07$; $0,92 \pm 0,14$; $0,31 \pm 0,05$; $0,12 \pm 0,02$; in der variiert gefütterten Gruppe + Ramipril $1,37 \pm 0,77$; $0,97 \pm 0,20$; $0,49 \pm 0,13$; $0,93 \pm 0,76$ und in der variiert gefütterten Gruppe + AVE 7688 $0,74 \pm 0,15$; $0,82 \pm 0,1$; $0,46 \pm 0,08$; $0,24 \pm 0,08$.

Die Ergebnisse der 2. Bestimmung von Gesamtcholesterin, Triglyceride und der HDL-/LDL-Fraktionen aus dem Serum sind in Abb.17a-d dargestellt.

Hinsichtlich des Gesamtcholesterins und der HDL-/LDL-Fraktionen unterscheidet sich die atherogen gefütterte Gruppe statistisch signifikant von den übrigen vier Gruppen.

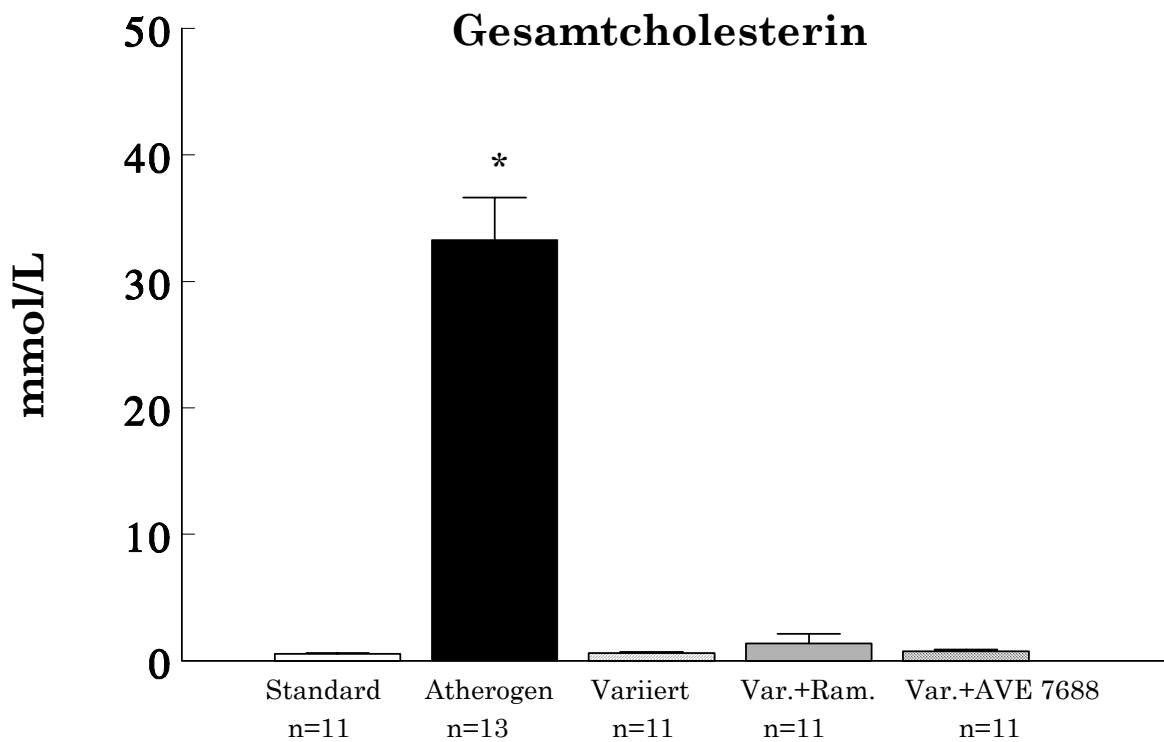


Abb.17a : Gesamtcholesterinspiegel (Angaben in mmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät, vs. Standard Diät, vs. Var.+ Ram., vs. Var.+ AVE 7688)

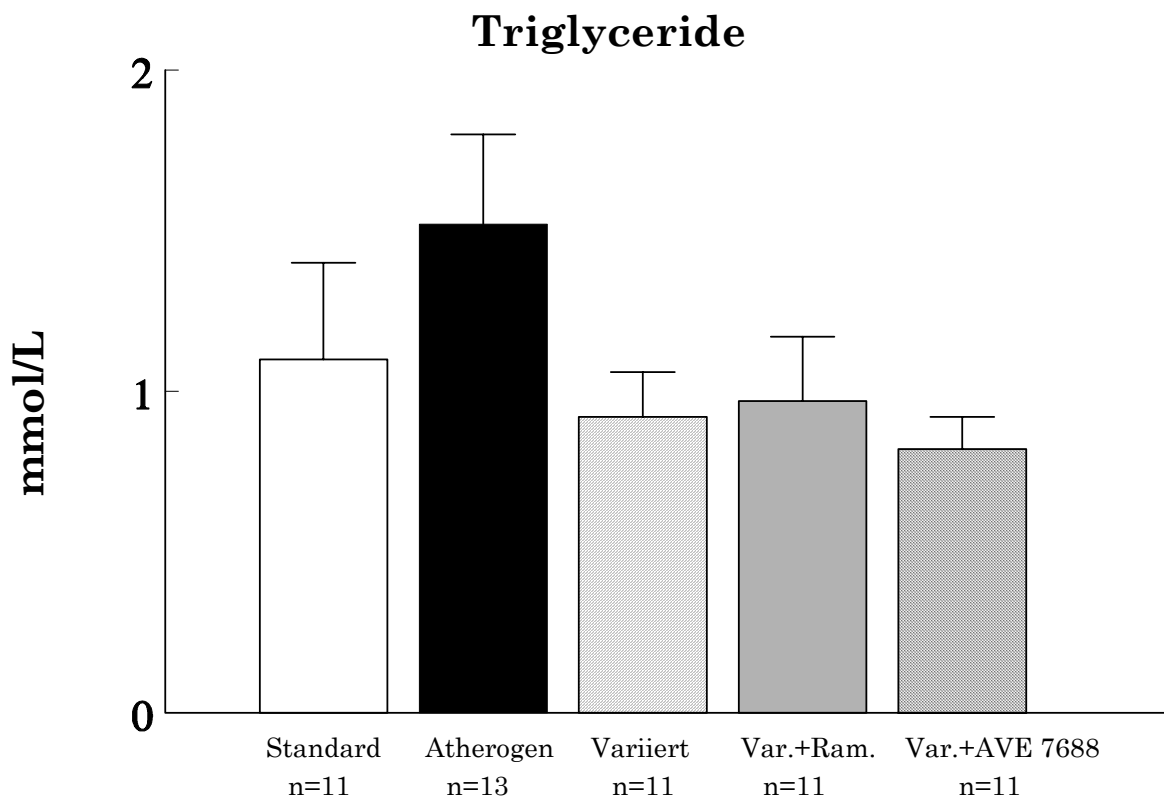


Abb.17b : Triglyceridspiegel (Angaben in mmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

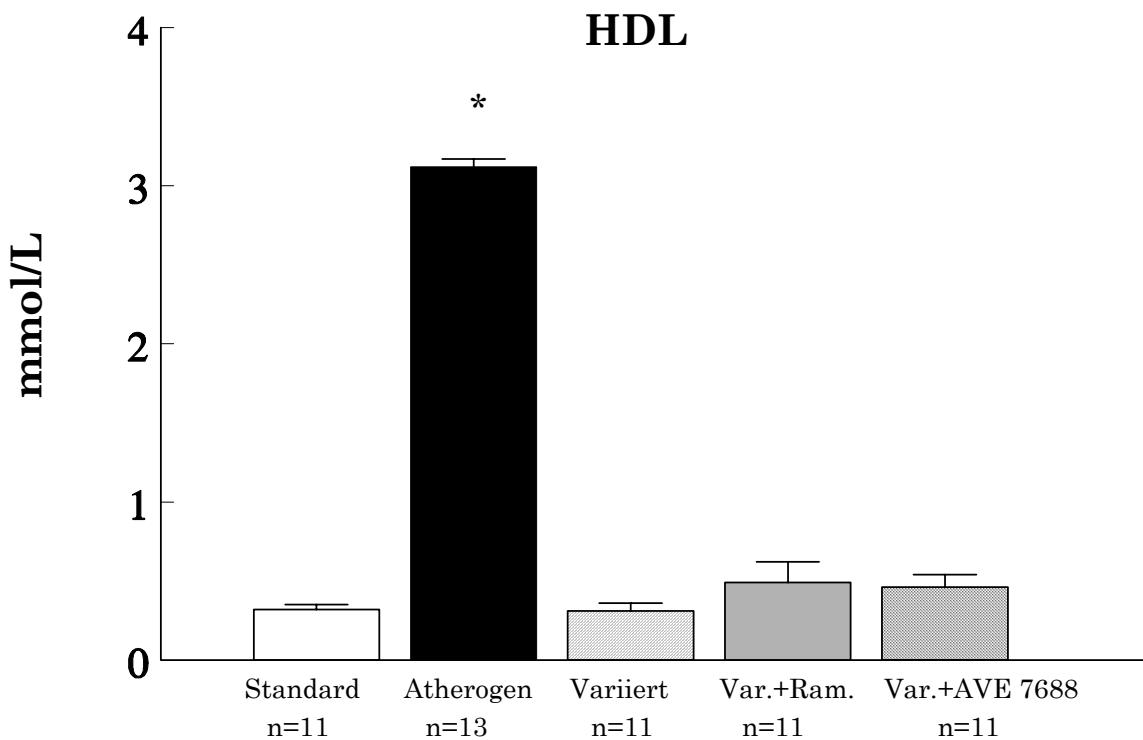


Abb.17c : HDL-Fraktion (Angaben in mmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät, vs. Standard Diät, vs. Var.+ Ram., vs. Var.+ AVE 7688)

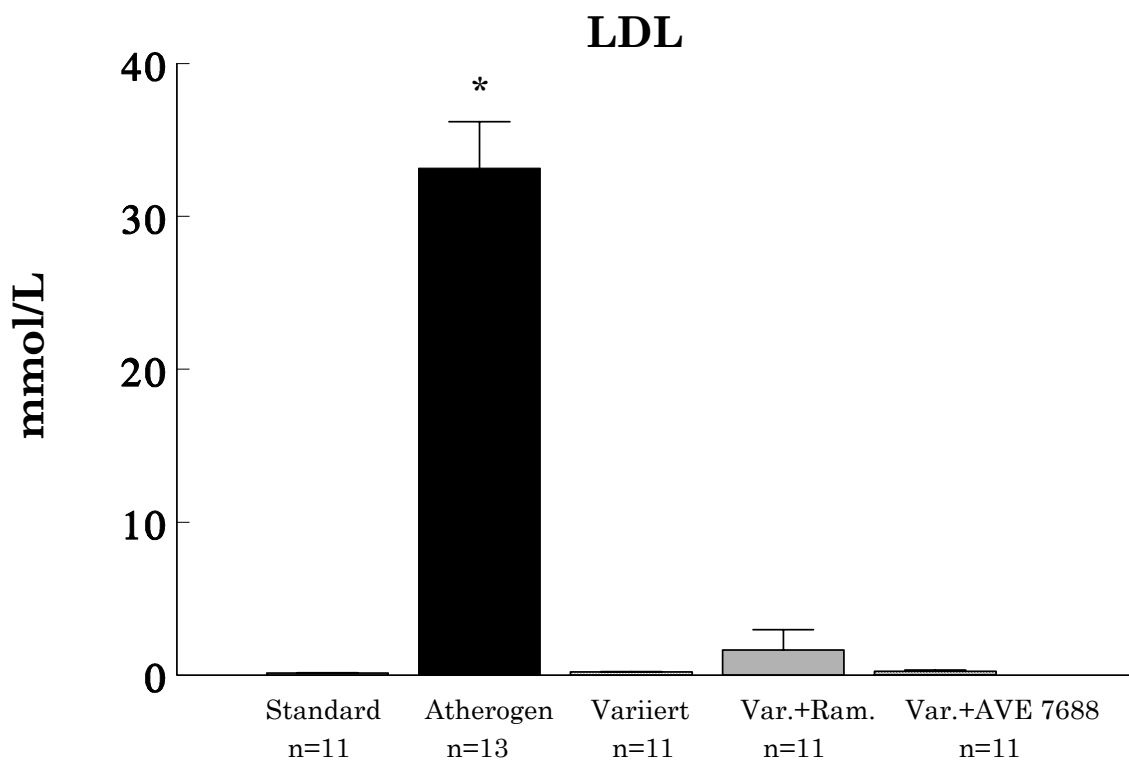


Abb.17d : LDL-Fraktion (Angaben in mmol/L; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät, vs. Standard Diät, vs. Var.+ Ram., vs. Var.+ AVE 7688)

III.7 Ergebnisse der Bestimmung des Big-Endothelins

Der gemessene Plasmaspiegel des Big-Endothelins ergab in der Standard-gefütterten Gruppe (in fmol/mL; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) $1,68 \pm 0,12$; in der atherogen gefütterten Gruppe $3,02 \pm 0,37$; in der variiert gefütterten Gruppe $4,97 \pm 1,23$; in der variiert gefütterten Gruppe + Ramipril $1,81 \pm 0,21$ und in der variiert gefütterten Gruppe + AVE 7688 $1,65 \pm 0,11$. Ein statistisch signifikanter Unterschied besteht zwischen der variiert gefütterten + AVE 7688 und der variiert gefütterten Gruppe.

Die Plasmaspiegel des Big-Endothelins der einzelnen Gruppen sind in Abb.18 graphisch dargestellt.

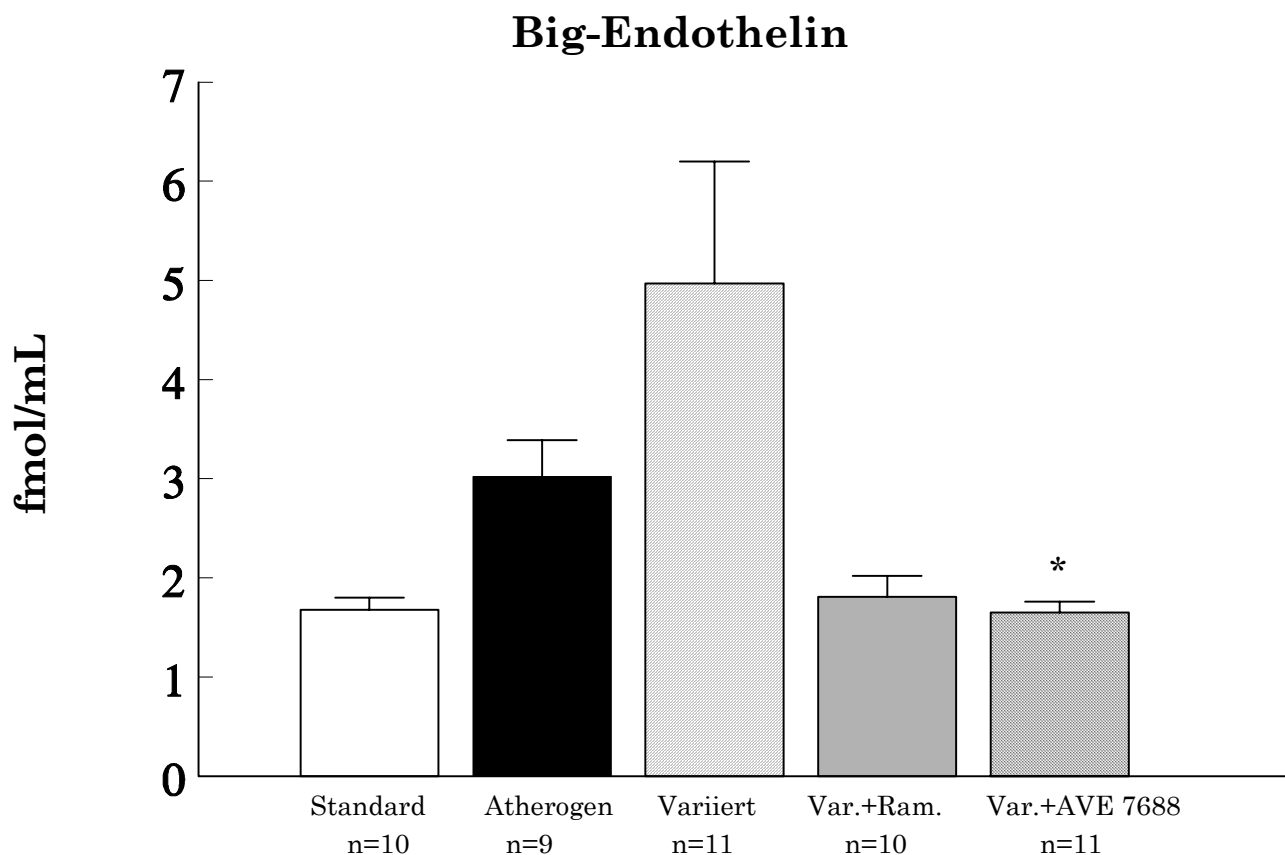


Abb.18 : Big-Endothelin (Angaben in fmol/mL; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. Variiert)

III.8 Ergebnisse der Bestimmung des von-Willebrand-Faktors

Der gemessene Plasmaspiegel des von-Willebrand-Faktors (vWF) betrug in der Standard-gefütterten Gruppe (in mU/mL; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) $39,05 \pm 7,06$; in der atherogen gefütterten Gruppe $81,14 \pm 12,46$; in der variiert gefütterten Gruppe $86,13 \pm 19,36$; in der variiert gefütterten Gruppe + Ramipril $38,68 \pm 5,01$ und in der variiert gefütterten Gruppe + AVE 7688 $33,70 \pm 4,17$.

Zwischen den einzelnen Gruppen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied.

Die Plasmaspiegel des vWF der einzelnen Gruppen sind in Abb.19 graphisch dargestellt.

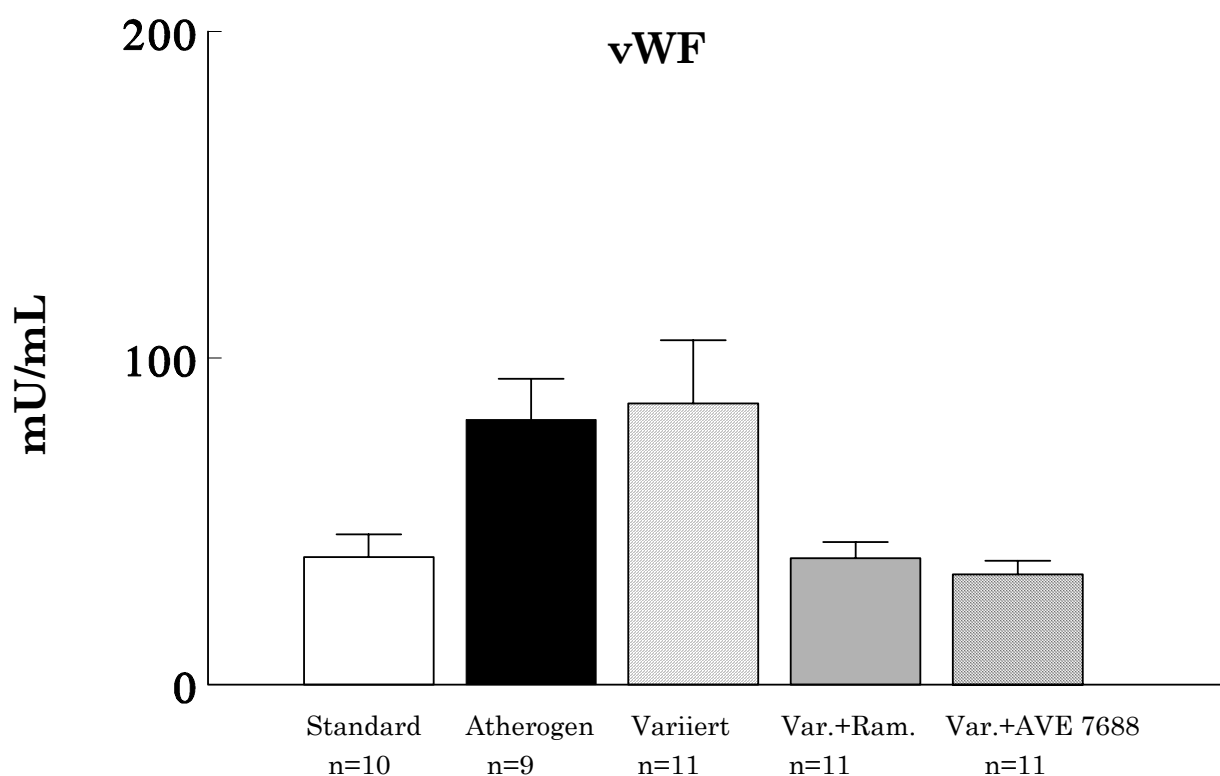


Abb.19 : Serumspiegel vWF (Angaben in mU/mL; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

III.9 Nachweis der ACE-Aktivität

Die ACE-Aktivität im Serum betrug in der Standard-gefütterten Gruppe (in U/l; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) $109,91 \pm 7,67$; in der atherogen gefütterten Gruppe $129,31 \pm 7,09$; in der variiert gefütterten Gruppe $82,45 \pm 9,82$; in der variiert gefütterten Gruppe + Ramipril $8,88 \pm 1,39$ und in der variiert gefütterten Gruppe + AVE 7688 $8,0 \pm 0,5$.

Die zusätzlich mit Ramipril oder AVE 7688 behandelten Gruppen zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der Standard-gefütterten, der atherogen gefütterten und der variiert gefütterten Gruppe.

Die ACE-Serumspiegel der einzelnen Gruppen sind in Abb.20 graphisch dargestellt.

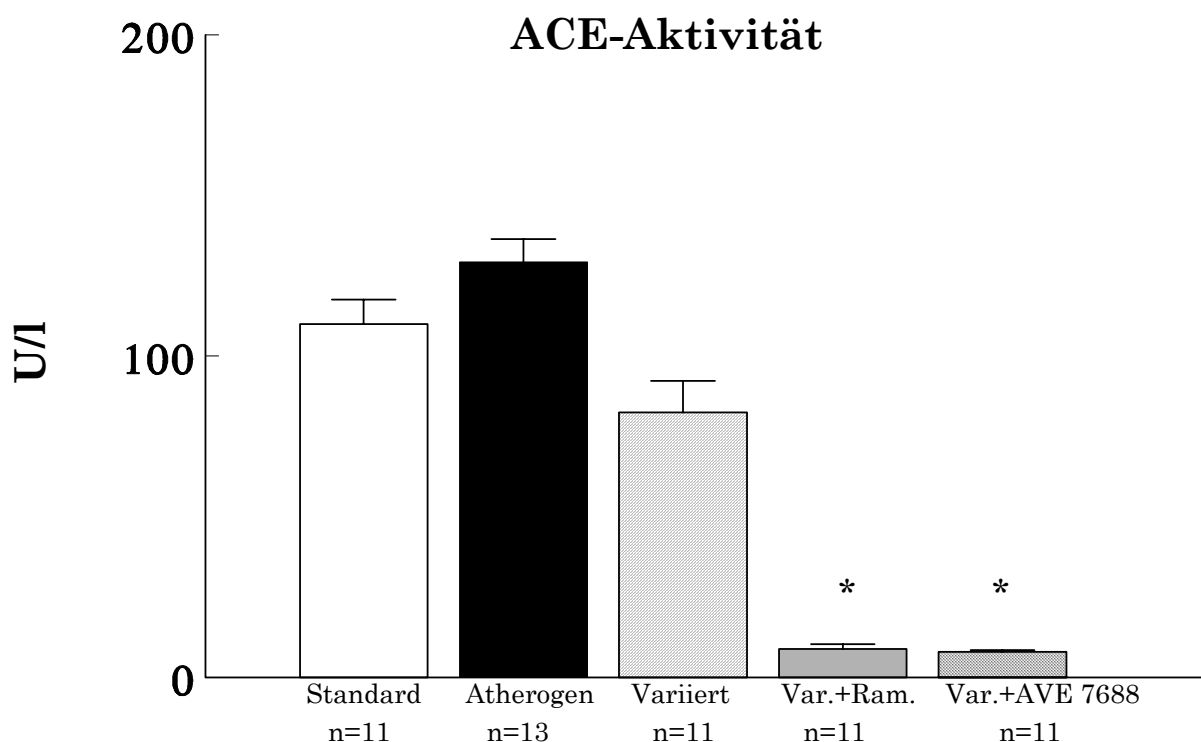


Abb.20 : ACE-Aktivität (Angaben in U/l; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät, vs. standard Diät, vs. atherogene Diät)

III.10 Organgewichte

Die Mittelwerte der Organgewichte vom linken und rechten Herzventrikel und linker und rechter Niere sind in Tab.6 (in g/kg KGW) dargestellt.

Die Gewichte der linken Niere der variiert gefütterten Gruppe + AVE 7688 unterscheiden sich signifikant von allen anderen Gruppen.

Bei den Gewichten der rechten Niere gibt es ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen der variiert gefütterten Gruppe + AVE 7688 und der Standard-gefütterten Gruppe sowie zur atherogen gefütterten Gruppe.

Gruppen	linker Ventrikel	rechter Ventrikel	linke Niere	rechte Niere
Standard	1,25 ± 0,04	0,36 ± 0,02	2,27 ± 0,07	2,28 ± 0,08
Atherogen	1,30 ± 0,02	0,39 ± 0,01	2,47 ± 0,12	2,39 ± 0,12
Variiert	1,31 ± 0,06	0,35 ± 0,02	2,50 ± 0,09	2,55 ± 0,10
Var.+ Ram.	1,23 ± 0,02	0,39 ± 0,02	2,71 ± 0,12	2,78 ± 0,12
Var.+ AVE 7688	1,23 ± 0,02	0,39 ± 0,01	3,36 ± 0,21 * + # °	3,41 ± 0,23 + #

Tab.6 : Durchschnittliche Gewichte der Herzventrikel und Nieren (Angaben in g/kg KGW; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).(*: $p < 0,05$ vs. variierte Diät; +: $p < 0,05$ vs. Atherogen; #: $p < 0,05$ vs. Standard; °: $p < 0,05$ vs. Var.+ Ram.)

IV Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, die Wirkung von Ramipril und AVE 7688 auf die sich entwickelnde endotheliale Dysfunktion sowie die atherosklerotischen Veränderungen am Modell des cholesteringefütterten Kaninchens zu untersuchen und miteinander zu vergleichen.

Mit Hilfe dieser beiden Substanzen wurde der Einfluss der Hemmung des Renin-Angiotensin Systems auf die Gefäßfunktion, die Entwicklung atherogener Plaques, verschiedener Blutparameter sowie die Organgewichte getestet.

IV.1 Der Einfluß von ACE- und ACE-NEP-Hemmung auf das vaskuläre System

An verschiedenen Atherosklerosemodellen wurden in zahlreichen tierexperimentellen Studien direkte vaskuloprotektive Effekte von ACE-Hemmern gezeigt (Aberg & Ferrer, 1990; Becker et al., 1991; Chobanian et al., 1990 & 1992; Capron et al., 1991; Campbell et al., 1992), die auch in klinischen Studien bestätigt wurden (Yusuf et al., 2001; Lonn et al., 2001; Mancini et al., 1996). Für ACE-NEP-Inhibitoren gibt es jedoch noch keine veröffentlichten Untersuchungen an solchen „atherogenen“ Tiermodellen.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit an dem etablierten Modell des atherogen gefütterten Kaninchens der ACE-NEP Inhibitor AVE 7688 im direkten Vergleich zu dem ACE-Hemmer Ramipril untersucht.

Der Hauptfokus war auf die Untersuchungen gerichtet, die eine direkte Beurteilung der Gefäßfunktion ermöglichten.

Bei den *in vivo* Blutdruckmessungen wurden zunächst die Basalwerte der Gruppen miteinander verglichen, um die Ausgangssituation beurteilen zu können. Der mittlere basale Blutdruck zeigte sich in der mit AVE 7688 behandelten Gruppe signifikant zur Placebogruppe erniedrigt. Ebenso wiesen die mit Ramipril behandelten Tiere eine tendenzielle Senkung auf, was eine Wirkung der Substanzen hinsichtlich ihrer Primärindikation Hypertension bestätigt (Hilleman, 2000; Nathisuwan, 2002). Bei der Herzfrequenz waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen, d.h. dass es nicht zu einer reflektorischen Freisetzung von Katecholaminen kam, wie es z.B. häufig bei Kalziumantagonisten beobachtet wird (Lehmann et al., 1989; Grossmann et al., 1998).

Wurde das Vorläuferpeptid von Ang II, Ang I verabreicht, zeigte sich ein nur geringer Blutdruckanstieg bei den behandelten Tieren, da durch die ACE-Hemmung die Umwandlung von dem biologisch inaktiven Ang I in Ang II und damit die weiteren Reaktionen, die zur Kalziumerhöhung im glatten Gefäßmuskel führen, blockiert sind.

Eine tendenziell verstärkte Blutdrucksteigerung auf die Gabe von Ang I bei den atherogen gefütterten Tieren im Vergleich zu den Standard-gefütterten Tieren lässt sich durch eine LDL-induzierte Hochregulation der AT₁-Rezeptoren erklären (Nickenig et al., 1997). Diese Ergebnisse stimmen mit den *in-vitro* Messungen an der isolierten Aorta im Organbad nach Gabe von Ang I überein. Auch hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Kontraktion in der atherogen gefütterten Gruppe gegenüber den Standard-gefütterten Tieren. Selbst in der variiert gefütterten Placebogruppe konnte eine

tendenzielle Verstärkung der Ang II-induzierten Kontraktion gezeigt werden. Um weitere Hinweise auf die Intaktheit des Endothels zu gewinnen, wurde identisch zur Ang I-Gabe das blutdrucksenkende Peptid Bradykinin gegeben. Bradykinin zeigte *in vivo* ein entgegengesetztes Bild zu den Ang I Effekten: starke Blutdrucksenkung in den behandelten Gruppen, signifikant abgeschwächten Blutdruck in den nichtbehandelten Gruppen.

Bradykinin erhöht das intrazelluläre Calcium in der Endothelzelle, stimuliert dadurch die eNOS, was zu einer Bildung von NO führt (Linz et al., 1995). Die verminderte Reaktion auf Bradykinin bei den atherogenen Tieren *in vivo* ist wohl hauptsächlich auf eine reduzierte eNOS-Aktivität zurückzuführen (Andersen & Stender, 2000). So konnte zum einen nachgewiesen werden, dass erhöhte Konzentrationen von oxidiertem LDL, wie sie bei Hypercholesterinämie zu finden sind, die Halbwertszeit der eNOS-mRNA verkürzen und dadurch deren Expression vermindern (Jessup et al., 1996). Weiterhin sind bei Hypercholesterinämie erhöhte Plasmaspiegel endogener eNOS-Inhibitoren, wie z.B. azyklisches Dimethyl-Arginin (ADMA), festgestellt worden, wodurch die NO-Bildung eingeschränkt sein könnte (Böger et al., 1997).

Weitere Untersuchungen zur Funktionalität der Gefäße wurden in dieser Arbeit durch die Messungen am Organbad erbracht.

Hinsichtlich der Kontraktionsfähigkeit nach Phenylephringabe (Phe) zeigten die Aortenpräparationen der atherogen gefütterten Gruppe eine signifikante Abschwächung gegenüber der Standard-gefütterten Gruppe. Mit Ramipril oder AVE 7688 aber auch mit variierter Diät gefütterte Tiere zeigten eine signifikant verbesserte Kontraktion nach Phe gegenüber den atherogen gefütterten Kaninchen. Ramipril

wies eine geringfügig bessere Kontraktion gegenüber AVE 7688 auf und war somit zusätzlich gegenüber der variierten Gruppe signifikant. Die Gefäße dieser Kaninchen erlangten fast die gleiche Kontraktionskraft wieder, wie die ausschließlich mit Standardfutter gefütterten Tiere. Finta et al. bestätigten diese Ergebnisse bei exakt gleichem Versuchsaufbau.

Andere Arbeitsgruppen zeigten ebenfalls stark reduzierte vaso-konstriktorische Wirkung von α -adrenergen Agonisten in atherosklerotisch geschädigten Aorten (Verbeuen et al., 1986; Pfister et al., 1996). Dagegen konnten an anderen atherogenen Gefäßen von Kaninchen genau gegensätzliche Effekte mit verschiedenen vaso-aktiven Stimuli, wie Noradrenalin oder KCL, erzeugt werden. Heinle et al. zeigten eine Hypersensitivität durch Noradrenalin an atherogenen Carotiden und somit eine Verstärkung der Kontraktionskraft. Diese Unterschiede sind hauptsächlich auf die verschiedenen Gefäße sowie ungleiche Testbedingungen zurückzuführen, aber auch unterschiedlich lange Behandlungszeiten und Zusammensetzungen der atherogenen Diät sind hier zu berücksichtigen.

Haupthinweis auf die Funktionalität des Endothels liefert die nach der Phe sich anschließende Relaxation durch Acetylcholin (ACh). Die durch ACh induzierte Vasorelaxation ist streng abhängig vom Vorhandensein eines intakten Endothels (Furchgott, 1980) und wird vermittelt von NO bzw. dem „endothelium-derived-relaxing-factor“ (EDRF) (Moncada & Higgs, 1991). Bei den *in vitro* Versuchen wurde zur endothelabhängigen Relaxation ACh eingesetzt, weil es *in vitro* an Blutgefäßen bei aufsteigenden Bradykinin-Konzentrationen zu einer Desensitivierung (Downregulation) des Bradykinin Subtyp 2

Rezeptors kommt (Munoz et al., 1993; Dendorfer et al., 1998), die *in vivo* nicht beobachtet wird.

In der vorliegenden Untersuchung kam es zu einer deutlichen Reduzierung der Relaxationsfähigkeit bei den 18 Wochen atherogen gefütterten Tieren. Auch bei den sechs Wochen atherogen gefütterten Tieren konnte der Endothelschaden durch die alleinige Futterumstellung nicht wieder völlig hergestellt werden. Durch die zusätzliche Fütterung von Ramipril und AVE 7688 erlangten die Aorten der Kaninchen jedoch ihre volle Relaxationsfähigkeit bei der höchsten ACh-Konzentration wieder zurück. Im Hinblick auf den Verlauf der Relaxation bewies AVE 7688 eine Überlegenheit gegenüber Ramipril. AVE 7688 zeigte schon bei 10^{-7} mol/L und allen weiteren Konzentrationen eine signifikante Verbesserung gegenüber der variiert gefütterten Gruppe. Für Ramipril ergab sich diese Signifikanz erst ab 10^{-6} mol/L ACh.

Der Rückgang der Relaxationsfähigkeit bei atherogenen Gefäßen ist zum größten Teil zurückzuführen auf eine verminderte Freisetzung von endogenem NO.

Diese Theorie wurde durch die zweite Relaxation der Aorten unter Natriumnitroprussid (SNP), einem exogenen NO-Donor, bestätigt. Durch Zugabe von SNP konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden. Das spricht dafür, dass die Media der Gefäße nicht geschädigt war, selbst bei 18 wöchiger atherogener Diät.

Viele Arbeitsgruppen bestätigen diese Ergebnisse hinsichtlich Ramipril (Becker et al., 1991; Finta et al., 1993; Berkenboom et al., 1997). Auch andere ACE-Hemmer zeigen gleiche positive Effekte auf

atherogene Gefäße (Illiano et al., 1994; Hernandez et al., 1998). Die Wirkung ist somit als ein Substanzklasseneffekt zu werten.

Unterstützt werden diese Ergebnisse weiterhin durch die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen der NO/O_2^- -Freisetzung. Sowohl die 18 Wochen als auch die 6 Wochen (variierte Diät) atherogen gefütterten Kaninchen zeigten eine signifikant reduzierte Freisetzung von NO gegenüber den anderen Gruppen. Bei mit Ramipril und AVE 7688 behandelten Tieren war die Calciumionophore-induzierte NO-Freisetzung stärker als bei der Gruppe mit Standarddiät. Mögliche Ursache für diesen Effekt könnte die Wirkung von NO als Antioxidans sein. Diese Wirkung besteht zum einen in der Verhinderung der Entstehung von ox. LDL und dem Schutz vor endothelialer Schädigung durch Radikalbildung (Bruckdorfer et al., 1990).

Diskutiert wird in diesem Zusammenhang eine Imbalance von NO und O_2^- infolge der endothelialen Dysfunktion (Wang et al., 2000).

Dies belegten auch die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte der O_2^- -Freisetzung. Die atherogene Gruppe setzte signifikant mehr Sauerstoffradikale frei als die Standard Gruppe. Auch andere Arbeitsgruppen finden in hypercholesterolämischen Kaninchen eine verstärkte O_2^- -Produktion (Ohara et al., 1993; Mügge et al., 1994).

Die mit AVE 7688 behandelten Tiere konnten die Freisetzung von O_2^- wieder auf den Wert der Standard Gruppe reduzieren. Die mit Ramipril behandelten Tiere wiesen dagegen weiterhin eine erhöhte O_2^- -Freisetzung auf, was wiederum die reduzierte Effektivität auf die ACh-induzierte endothelabhängige Relaxation im Organbad gegenüber AVE 7688 erklären dürfte.

Die herausragende Rolle freier Radikale und reduzierter NO-Verfügbarkeit als Verursacher der endothelialen Dysfunktion konnte mittlerweile bei der Hypercholesterinämie belegt werden (Cayatte et al., 1994). Superoxidanionen sind stark beteiligt am Abbau von NO und werden u.a. von Endothelzellen (Rosen et al., 1984) und glatten Gefäßmuskelzellen (Heinecke et al., 1986) gebildet. Es wurde nachgewiesen, dass an diesem Abbau Enzyme, wie die plasmamembrangebundene NADPH-Oxidase (Münzel et al., 1995) oder die bei Hypercholesterinämie vermehrt im Plasma vorkommende Xanthin-Oxidase, (White et al., 1996) beteiligt sind. O_2^- ist selbst ein wichtiger Stimulus für die Aktivierung der Proteinkinase C und sekundär der NADPH-Oxidase.

Die Halbwertszeit und damit die biologische Wirksamkeit von NO wird in entscheidendem Maße durch freie Radikale wie das O_2^- mitbestimmt. NO und O_2^- reagieren mit einer hohen Reaktionsgeschwindigkeit unter der Bildung des hochtoxischen Metaboliten Peroxynitrit. Peroxynitrit wiederum oxidiert BH₄ zu BH₂ und verstärkt die vaskuläre Superoxidbildung über eine Entkopplung der NO-Synthase (s. Abb.22). Auf weiterer zellulärer Ebene werden mit ACE beladene Makrophagen durch oxidiertes LDL zu Schaumzellen modifiziert, deren Depots als „fatty streaks“ in Erscheinung treten, jedoch reversibel sind. Dieses verstärkte Vorkommen von lokalem ACE führt zu einer vermehrten Produktion von Ang II und seiner Effekte wie Proliferation, Hypertrophie von glatten Muskelzellen, interstitielle Fibrose und weitere Aktivierung und Migration von Makrophagen.

Zusätzlich wird durch Ang II weiterhin die O_2^- -Freisetzung stimuliert und vermehrt NO inaktiviert.

Dies verdeutlicht den positiven Effekt der ACE-Hemmung auf die endotheliale Dysfunktion. Durch die Reduzierung der lokalen Ang II Produktion wird in den Circulus vitiosus eingegriffen.

Die Überlegenheit des ACE-NEP-Hemmers AVE 7688 bezüglich der Relaxation ist neben der verstärkt gehemmten O_2^- -Bildung auch mit der zusätzlichen Hemmung der neutralen Endopeptidase zu erklären. Ähnlich wie das ACE mit der Kinase II identisch, baut die NEP Bradykinin zu inaktiven Bruchstücken ab. Duale Hemmung des ACE und der NEP führen somit zu höheren Bradykininspiegeln. Die NEP inaktiviert aber auch das atriale natriuretische Peptid. Das ANP stimuliert die partikuläre Guanylatzyklase und führt zu erhöhten cGMP-Spiegeln, die unter Hemmung der NEP deutlich ansteigen (Bani et al., 2000; Wegner et al., 1996). cGMP vermindert intrazelluläres Ca^{++} in glatten Gefäßmuskelzellen.

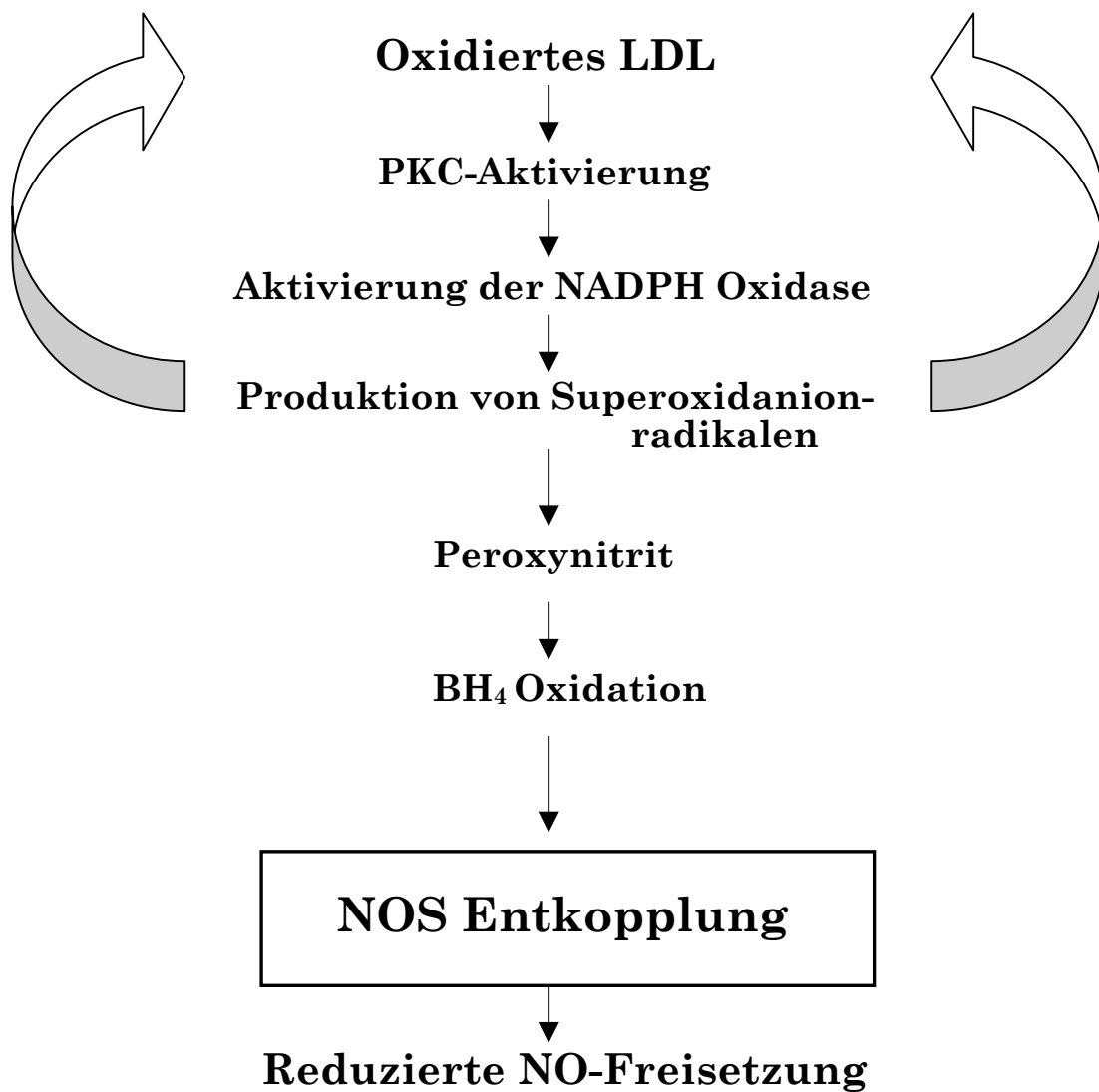


Abb.21 : Mechanismen der Endotheldysfunktion
(LDL= low density lipoprotein; PKC= Proteinkinase C;
NADPH= Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat;
BH₄= Tetrahydrobiopterin)

Zur Bestimmung der Plaquegröße wurde nur der Aortenbogen herangezogen, da nur dort die Ausprägung der atherosklerotischen Fläche eine für die Auswertung bedeutsame Größe aufwies.

Auch andere Untersuchungen belegten, dass beim atherogen-gefütterten Kaninchen die Plaques hauptsächlich im Aortenbogen zu finden sind (Jayakody et al., 1985 & 1988; Verbeuen et al. 1986).

Das ist dadurch bedingt, dass hier die größten Turbulenzen auftreten. In der weiteren thorakalen sowie in der abdominalen Aorta sind deutlich weniger Plaques vorhanden. Ähnliche Verhältnisse findet man auch in der menschlichen Aorta (Wissler et al., 1992).

Die Entwicklung der atheromatösen Veränderungen hängt von vielen Parametern ab, wie das Alter der Tiere (Javakody et al., 1988), Geschlecht (Hayashi et al., 1992), Gesundheitszustand, Menge des Cholesterinzusatzes oder Fütterungszeitraum. So zeigte Verbeuen et al. bei vergleichbarer Versuchslaufzeit und ähnlicher Cholesterinzusatzung, wie in der vorliegenden Arbeit, deutlich mehr Plaqueentwicklung. Auch firmeninterne nicht veröffentlichte Studien zeigten bei exakt gleich durchgeführten Versuchsbedingungen deutliche Unterschiede in der Plaqueentwicklung. Erklärungen hierfür könnten Virusinfektionen und/oder genetische Variationen der Tiere sein. Dies liefert einen Hinweis auf die teilweise schwierige Vergleichbarkeit der Studien. In der vorliegenden Arbeit konnten die Plaques der Ramipril Gruppe um mehr als 35 % reduziert werden, und auch in der AVE 7688 Gruppe wurden die atheromatösen Bereiche um 22 % verringert. Bei dieser Untersuchung zeigte Ramipril eine Überlegenheit gegenüber AVE 7688. Dieser Unterschied im Hinblick auf die Ergebnisse der Organbadmessungen sind mit den verschiedenen Abschnitten der Gefäße zu erklären. Bei

der Ölrotfärbung wurden ausschließlich die Aortenbögen verwendet, wohingegen im Organbad nur die vorderen thorakalen Bereiche der Aorta untersucht wurden.

IV.2 Ergebnisse weiterer Untersuchungen

Die Messung der Lipidwerte nach 6 Wochen diente hauptsächlich der Überprüfung der Anwendbarkeit der atherogenen Diät, um sicher zu sein, dass ausreichend hohe Spiegel vorhanden waren. Zu diesem Zeitpunkt hatten alle Kaninchen außer der Standard-gefütterten Kontrollgruppe hinsichtlich Gesamtcholesterin, LDL und HDL signifikant erhöhte Plasmaspiegel, so dass man von vergleichbaren Ausgangsbedingungen in den Gruppen ausgehen konnte.

Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Tiere wieder auf Standardfutter (außer der atherogenen Kontrollgruppe) gesetzt, um eine Ernährungsumstellung (bzw. Cholesterinsenkung) zum Zeitpunkt des Behandlungsstartes nachzuempfinden. Nach 12 Wochen Standardfutter zeigten alle Kaninchen eine statistisch signifikante Senkung des Gesamtcholesterins, HDL und LDL gegenüber der atherogenen Gruppe.

Der Nachweis der ACE-Aktivität diente als zusätzliche Bestätigung des Substanzeffektes. Die mit Ramipril oder AVE 7688 behandelten Tiere waren hoch signifikant in ihrer ACE-Aktivität reduziert. Die NEP-Aktivität lässt sich auch zuverlässig im Gewebe messen. Dies konnte jedoch aufgrund der sehr aufwendigen Methode in dieser Studie nicht durchgeführt werden.

Bei Big Endothelin und vWF handelt es sich um Parameter für endotheliale Dysfunktion. Der vWF aktiviert Thrombozyten und

leitet die Gerinnung ein (Hamer et al., 1986; Fressinaud & Meyer, 1991). Zahlreiche experimentelle und klinische Studien lassen erkennen, dass hohe vWF-Plasmaspiegel einen endothelialen Schaden reflektieren (Lip & Blann, 1997; Galatius et al., 1998). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten die atherogen gefütterten Tiere zumindest eine tendenzielle Erhöhung des vWF. Unter der Behandlung mit Ramipril und AVE 7688 wurde der Plasmaspiegel wieder auf Standard-Werte reduziert. Gibbs et al. konnte den gleichen Einfluß von ACE-Inhibitoren auf den vWF in einer klinischen Studie zeigen.

Beide, Big Endothelin und vWF, werden im Endothel gebildet und in das Lumen sowie apikal freigesetzt. Aus Big Endothelin entsteht das 21-Amino-Peptid Endothelin, welches als stärkster Vasokonstriktor bekannt ist (Yanagisawa et al., 1988; Borries et al., 1996; Aubin et al., 1997). Endothelin ist ein Gegenspieler zu NO und ist für die Feinregulierung des Blutdruckes in der Peripherie verantwortlich (Lüscher & Vanhoutte, 1990; Haynes & Webb, 1994; Spieker et al., 2000). Eine Imbalance zugunsten ET kann zur Erhöhung des peripheren Blutdruckes führen.

Der Big Endothelinspiegel ist ebenfalls erhöht bei Atherosklerose. Bei Big Endothelin handelt es sich um einen sehr sensitiven Marker für endothelialen Schaden (Lerman et al., 1995; Mathew et al., 1996). Da es jedoch bei jeder Krankheit, die mit einem Schaden des Endothels einhergeht, erhöht ist, stellt es keinen sehr spezifischen Parameter dar (Lerman et al., 1991). Des weiteren ist der Wirkmechanismus und die Signifikanz von erhöhtem Endothelin noch nicht bekannt, so dass es schwierig ist eine Erklärung für die deutliche Erhöhung der variiert gefütterten gegenüber der atherogenen Gruppe zu finden.

Prinzipiell zeigten jedoch die atherogen gefütterten Tiere höhere Plasmaspiegel von Big Endothelin und die Behandlung mit Ramipril und AVE 7688 reduzierten diese deutlich, so dass man von einer Regenerierung des endothelialen Schadens unter der Behandlung mit ACE bzw. ACE-NEP-Inhibitoren ausgehen kann.

Hinsichtlich der Organgewichte zeigten die vorliegenden Ergebnisse nur ein signifikantes Ansteigen der rechten und linken Niere bei den mit AVE 7688 behandelten Tieren. Bei den Herzgewichten zeigten sich keine Unterschiede in den verschiedenen Gruppen. Der pathologische Bericht (Dr. med. vet. T. Bartels, Veterinary Pathologist, Aventis Pharma Deutschland GmbH) bestätigt diese Veränderungen als Mineralisation der Nierentubuli und interstitielle Fibrose. Solche Veränderungen finden sich häufig spontan im Kaninchen. Dass die Veränderungen auf die Substanz zurückzuführen sind, scheint prinzipiell möglich, da sich in der Niere hohe Konzentrationen von NEP befinden, ist aber relativ unwahrscheinlich, da in einer vergleichbaren nicht veröffentlichten Studie von Aventis diese Veränderungen unter AVE 7688 nicht zu finden waren.

IV.3 Abschliessende Betrachtung

Neuere klinische Studien wie HOPE (HHeart Outcomes Prevention Evaluation, Yusuf et al., 2001) SECURE (Study to Evaluate Carotid Ultrasound changes in patients treated with Ramipril and Vitamin E, Lonn et al., 2001) und APRES (The Angiotensin-converting enzyme inhibition Post REvascularization Study, Kjøller-Hansen et al., 2000) zeigen, dass ACE-Inhibitoren wie Ramipril die Prognose

von Patienten mit hohem Risiko für atherothrombotische kardiovaskuläre Ereignisse verbessern. Aus diesen Gründen wurde Ramipril als erster ACE-Hemmer kürzlich zur Risikosenkung bei Herz-Kreislaufferkrankungen zugelassen. Experimentelle Arbeiten haben gezeigt, dass der kardioprotektive Effekt zum Teil über die Hemmung des Kininabbaus und die Freisetzung von NO vermittelt wird. Eine kombinierte Hemmung von ACE und NEP verhindert somit noch effektiver die Inaktivierung von Bradykinin, denn diese beiden Enzyme sind die wichtigsten für den Bradykininabbau. In experimentellen Arbeiten zeigte sich ein deutlicher Vorteil dieses dualen Wirkkonzeptes im Vergleich zu ACE-Hemmern alleine (Corti et al., 2001). Klinische Studien bestätigten diese Überlegenheit sowohl in der Behandlung der arteriellen Hypertonie, als auch in der Herzinsuffizienz (Mitchell et al., 1999). Hinsichtlich der untersuchten Parameter für endotheliale Dysfunktion konnte in der vorliegenden Arbeit die Überlegenheit von AVE 7688 gegenüber Ramipril nur für einzelne Untersuchungen eindeutig gezeigt werden. So zeigten z.B. die Ergebnisse der Organbaduntersuchungen eine signifikante Verbesserung der Aortenrelaxation unter AVE 7688 und auch die Freisetzung von O_2^- Radikalen ist deutlicher gesenkt als unter alleiniger ACE-Hemmertherapie. Viele weitere Ergebnisse jedoch zeigten direkt vergleichbare Effekte von Ramipril und AVE 7688. Einige wenige Untersuchungen, wie z.B. die Plaqueausbreitung im Aortenbogen wiesen sogar eine leichte Überlegenheit des ACE-Hemmers Ramipril auf. Zu beachten ist, dass durch die Hemmung des Bradykininabbaus, es zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Reizhusten und in seltenen Fällen Angioödem kommen kann. Die Reizhustenhäufigkeit unter ACE-NEP-Hemmung ist vergleichbar mit der Rate bei ACE-Hemmertherapie. Neue publizierte Daten zeigen

jedoch ein 2-3x häufigeres Auftreten von Angioödemem unter der Behandlung mit ACE-NEP-Inhibitoren im Vergleich zu ACE-Hemmern. Bei der OCTAVE Studie (Omapatrilat Cardiovascular Treatment Assessment Versus Enalapril, The OCTAVE study group, 2002) wurden 25000 Patienten mit Omapatrilat (20 mg einmal täglich) versus Enalapril (5 mg zweimal täglich) behandelt. Es zeigte sich mit Omapatrilat (ACE-NEP-Hemmer) eine signifikant bessere Senkung des systolischen Blutdruckes als mit Enalapril (ACE-Hemmer), jedoch eine dreifach erhöhte Inzidenz von Angioödemem (Omapatrilat 2,17% vs. Enalapril 0,68 %). In der OVERTURE Studie (Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events, Packer et al., 2002) wurden 5770 Patienten mit NYHA II, III, IV und einer Ejektionsfraktion < 30% untersucht. Es wurde Omapatrilat (40 mg einmal täglich) vs. Enalapril (10 mg zweimal täglich) zur zusätzlichen Standardtherapie (50% β -Blocker, 40% Spironolacton, 60% Digoxin) verabreicht. Der ACE-NEP-Hemmer zeigte in dieser Studie keine Überlegenheit gegenüber dem ACE-Hemmer, jedoch knapp zweifach erhöhte Inzidenz von Angioödemem (Omapatrilat: 0,8% vs. Enalapril 0,5%). Auffällig war, dass bei herzinsuffizienten Patienten die Inzidenz von Angioödemem im Vergleich zum Hochdruckpatienten deutlich vermindert war. Da es sich bei dem Angioödem um eine potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkung handelt, bleibt abzuwarten ob dieses pathophysiologisch überzeugende Therapiekonzept der dualen Hemmung von ACE und NEP weiter entwickelt werden kann.

V Zusammenfassung

Trotz verbesserter Möglichkeiten der Diagnose und Therapie stehen Herz-Kreislaufferkrankungen an erster Stelle der Todesursachen in den Industrienationen. Die endotheliale Dysfunktion wird durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, Hypertension, Adipositas und Rauchen begünstigt und bildet somit die gemeinsame Endstrecke zur Atherosklerose.

In dieser Arbeit wurden die pharmakologischen Wirkungen von ACE und ACE-NEP-Inhibitoren auf die endotheliale Dysfunktion am Modell des atherogen gefütterten Kaninchens untersucht. Der Fokus der Arbeit lag in der Beurteilung der Endothelfunktion unter dem Einfluss des ACE-Hemmers Ramipril und des ACE-NEP-Inhibitors AVE 7688.

Unterschiedliche Parameter, wie die Endothelfunktion, Blutdruckänderungen, Plaqueausbreitung, endotheliale Stickstoffmonoxid- und Superoxidfreisetzung sowie Plasmaspiegel verschiedener Blutparameter, wurden für diese Untersuchungen herangezogen. Als Kontrollgruppen dienten durchgehend Standard-gefütterte Tiere (Normalfutter), durchgehend atherogen gefütterte Tiere sowie als direkte Kontrolle zu den variiert gefütterten + behandelten Tieren mit Ramipril und AVE 7688 eine variiert gefütterte Gruppe (6 Wochen atherogene Diät, anschließend 12 Wochen Standardfutter). Alle gemessenen Parameter zeigten unter dem Einfluss der beiden Behandlungsansätze einen deutlich positiven Effekt auf die endotheliale Dysfunktion.

Die Endothelfunktion im Organbad konnte in der ACE-NEP-Hemmer behandelten Gruppe stärker verbessert werden als in der ACE-

Hemmer behandelten Gruppe. Dies bestätigten die Ergebnisse der endothelialen O_2^- -Freisetzung. In Bezug auf die NO-Freisetzung und die Ausbreitung der Plaques im Aortenbogen zeigte Ramipril dagegen eine leichte Überlegenheit gegenüber AVE 7688.

Hinsichtlich der positiven Beeinflussung von ACE-Inhibitoren auf die endotheliale Dysfunktion bestätigen diese Ergebnisse eine Vielzahl anderer tierexperimenteller und klinischer Studien.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal für ACE-NEP-Hemmung in einem Atherosklerosemodell ein protektiver Effekt auf die endotheliale Funktion gezeigt werden.

Eine deutliche Überlegenheit von ACE-NEP-Inhibitoren gegenüber ACE-Inhibitoren wie sie in präklinischen und klinischen Studien bezüglich Hypertonie und Herzinsuffizienz gezeigt wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit auch in Bezug auf die endotheliale Dysfunktion bestätigt werden.

VI Summary

Cardiovascular disease is the major cause of death in western nations, although improved possibilities regarding diagnosis and therapy exist. Endothelial dysfunction is triggered by cardiovascular risk factors such as hypercholesteremia, hypertension, adipositas and smoking contributing by this common endpoint to atherosclerosis.

This study examined the pharmacological effects of ACE- and ACE-NEP inhibitors on endothelial dysfunction in the model of atherosclerotic rabbits. The focus of the study was to assess endothelial function after treatment with the ACE inhibitor ramipril and the ACE-NEP inhibitor AVE 7688. Different parameters such as endothelial function, blood pressure, expansion of plaques, endothelial nitric oxide and superoxide release and plasma levels of various parameters were analyzed. Control groups consisted of one group fed only control food (normal diet), one group fed only atherogenic diet and the direct control group fed varied diets (6 weeks atherogenic diet followed by 12 weeks control food) like the animals treated with ramipril and AVE 7688. All measured parameters indicate a significant favorable effect on endothelial dysfunction as a result of the influence of the two treatment regimens.

Endothelial function measured in the organ chamber showed greater improvement in the ACE-NEP treated group than in the ACE treated group. This was correlated to the endothelial superoxide release. Regarding the nitric oxide release and the expansion of plaques in the aortic arch ramipril showed a slight superiority compared to AVE 7688. The positive influence of ACE inhibitors on endothelial

dysfunction could be confirmed in a large number of other experimental and clinical studies.

In this study for the first time a protective effect on endothelial function by ACE-NEP inhibition was shown in an animal model for atherosclerosis. The superior efficacy of ACE-NEP inhibitors versus ACE inhibitors which has been demonstrated in several preclinical and clinical studies examining hypertension and heart failure could also be verified in this study for endothelial dysfunction.

VII Literaturverzeichnis

Aberg G., Ferrer P. (1990). *Effects of captopril on atherosclerosis in cynomolgus monkeys.* J. Cardiovasc. Pharmacol., 15: 65-72

Anderson MR., Stender S. (2000). *Endothelial nitric oxide synthase activity in aorta of normocholesterolemic rabbits: regional variation and the effect of estrogen.* Cardiovasc. Res., 47 (1): 192-199

Anitschkow N., Chalатов S. (1913). *Über experimentelle Colesterin-Steatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger Pathologischer Prozesse.* Centralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, 24: 1-9

Aubin P., Le-Brun G., Moldovan F., Villette JM., Creminon C., Dumas J., Homyrda L., Soliman H., Azizi M., Fiet J. (1997). *Sandwich-type enzyme immunoassay for big endothelin-I in plasma: concentrations in healthy human subjects unaffected by sex or posture.* Clin. Chem., 43 (1): 64-70

Bani M., Colantoni A., Guillaume M., Macci F., Moroni G., Persiani S. (2000). *A double-blind, placebo-controlled study to assess tolerability, pharmacokinetics and preliminary pharmacodynamics of single escalating doses of Z13752A, a novel dual inhibitor of the metalloproteases ACE and NEP, in healthy volunteers.* Br. J. Clin. Pharmacol., 50 (4): 338-349

Becker RHA., Wiemer G., Linz W. (1991). *Preservation of endothelial function by Ramipril in rabbits on a long-term atherogenic diet.* J. Cardiovasc. Pharmacol., 18 (Suppl.2): 110-115

Berkenboom G., Langer I., Carpentier Y., Grosfils K., Fontaine J. (1997). *Ramipril prevents endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins. A bradykinin-dependent mechanism.* Hypertension, Vol 30, No 3, Part 1: 371-376

Bocan MA. (1998). *Animal models of atherosclerosis and interpretation of drug intervention.* C. of Pharmacol. Design, 4: 37-52

- Boeger RH., Bode-Böger SM., Thiele W., Junker W., Alexander K., Fröhlich JC. (1997).** *Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease.* Circulation, 95: 2068-2074
- Borries M., Heins M., Fischer Y., Stiegler H., Schoebel FC., Reinauer H., Strauer BE., Leschke M. (1996).** *Endothelin und Big-Endothelin bei der koronaren Herzerkrankung und akuten Koronarsyndromen.* Z. Kardiol., 85(10): 761-767
- Brown MS., Goldstein JL. (1983).** *Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis.* Annu. Rev. Biochem., 52: 223-261
- Brown NJ., Vaughan DE. (1998).** *Angiotensin-converting enzyme inhibitors.* Circulation, 97(14): 1411-1420
- Bruckdorfer KR., Jacobs M., Rice-Evans C. (1990).** *Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide), lipoprotein oxidation and atherosclerosis.* Biochem. Soc. Trans., 18: 1061-1063
- Busse R., Fleming I., Hecker M. (1993).** *Endothelium-derived bradykinin: implications for angiotensin-converting enzyme-inhibitor therapy.* J. Cardiovasc. Pharmacol., 22 (Suppl.5): 31-36
- Campbell JH., Fennessy P., Campbell GR. (1992).** *Effect of perindopril on the development of atherosclerosis in the cholesterol-fed rabbit.* Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 19: 13-17
- Cao L., Gardener DG. (1995).** *Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts.* Hypertension, 25: 227-234
- Capron L., Heudes D., Chajara A., Bruneval P. (1991).** *Effect of ramipril, an inhibitor of angiotensin converting enzyme, on the response of rat aorta to injury with a balloon catheter.* J. Cardiovasc. Pharmacol., 18: 207-211

- Cayatte AJ., Palacino JJ., Horten K., Cohen RA. (1994).** *Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointimal formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits.* Arterioscler. Thromb., 14: 753-759
- Chen HH., Burnett JC. (1998).** *C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system.* J. Cardiovasc. Pharmacol., 32 (Suppl.3): 22-28
- Chen MF., Hsu HC., Liao CS., Lee YT. (1999).** *The role of vitamin E on the anti-atherosclerotic effect of fish oil in diet-induced hypercholesterolemic rabbits.* Prostaglandins Other Lipid Mediat., 57 (2-3): 99-111
- Chobanian AV. (1990).** *The effects of ACE inhibitors and other antihypertensive drugs on cardiovascular risk factors and atherogenesis.* Clin. Cardiol., 13: VII-43-VII-48
- Chobanian AV., Haudenschield CC., Nickerson C., Drago R. (1990).** *Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit.* Hypertension, 15: 327-331
- Chobanian AV., Haudenschield CC., Nickerson C., Hope S. (1992).** *Trandolapril inhibits atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit.* Hypertension, 20: 473-477
- Corti R., Burnett JC., Rouleau JL., Ruschitzka F., Luscher TF. (2001).** *Vasopeptidase inhibitors: a new therapeutic concept in cardiovascular disease?* Circulation, 104: 1856-1862
- Cushman DW., Cheung HS., Sabo EF., Ondetti MA. (1977).** *Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids.* Biochemistry, 16: 5484-5491
- Demer LL., Watson KE., Boström K. (1994).** *Mechanisms of calcification in atherosclerosis.* Trends Cardiovas. Med., 4: 45-49
- Dendorfer A., Wolfrum S., Dominiak P. (1998).** *Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system.* Jpn. J. Pharmacol., 79: 403-426

- de Smet BJGL., van der Zande J., van der Helm YJM., Kuntz RE., Borst C., Post MJ. (1998).** *The atherosclerotic Yucatan animal model to study the arterial response after balloon angioplasty: the natural history of remodeling.* Cardiovasc. Res., 39: 224-232
- Diet F., Pratt RE., Berry GJ., Momose N., Gibbons GH., Dzau VJ. (1996).** *Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease.* Circulation, 94: 2756-2767
- Dresel HA. (1989).** *Die mögliche Bedeutung von LDL Scavenger-Rezeptoren in der Pathogenese der Arteriosklerose bei Hypercholesterinämie.* Arteriosklerose, Klose G. (Hrsg.), Springer Verlag
- Dzau VJ. (1984).** *Vascular renin-angiotensin: a possible autocrine or paracrine system in control of vascular function.* J. Cardiovasc. Pharmacol., 6 (Suppl 2): 377-382
- Dzau VJ. (1988).** *Evolving concepts of the renin-angiotensin system. Focus on renal and vascular mechanisms.* Am. J. Hypertens., 1(4Pt2): 334-337
- Dzau VJ. (1988).** *Circulation versus local renin angiotensin systems in cardiovascular homeostasis.* Circulation, 77(Suppl 1): I4-I13
- Dzau VJ. (1993).** *Tissue renin-angiotensin system in myokardial hypertrophy and failure.* Arch-Intern-Med., 153(8): 937-942
- Eggena P., Krall F., Eggena MP., Clegg K., Fittingoff M., Barrett (1990).** *Production of angiotensinogen by cultured rat aortic smooth muscle cells.* Clin. Exper. Hyper. Theory and Practice, A12(7): 1175-1189
- Falk E., Fernandez-Ortiz A. (1995).** *Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications.* Am. J. Cardiol., 75: 5B-11B
- Faruqi RM., DiCorleto PE. (1993).** *Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation.* Br. Heart J., 69(Suppl): 19-29

- Fink CA., Carlson JE., Mc Taggart PA., Qiao Y., Webb R., Chatelain R., Yeng AY., Trapani AJ. (1996).** *Mercaptoacyl dipeptides as orally active dual inhibitors of angiotensin-converting enzyme and neutrale endopeptidase.* J. Med. Chemistry., 39: 3158-3168
- Finta KM., Fischer MJ., Lee L., Gordan D., Pitt B., Webb RC. (1993).** *Ramipril prevents impaired endothelium-dependent relaxation in arteries from rabbits fed with an atherogenic diet.* Atherosclerosis, 100: 149-156
- Fournie-Zaluski MC., Coric P., Thery V., Gonzalez W., Meudal H., Turcaud S., Michel JB., Roques BP. (1996).** *Design of orally active dual inhibitors of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme with long duration of action.* J. Med. Chemistry, 39: 2594-2608
- Freimann PC., Mitchell GG., Heistad DD., Armstrong ML., Harrison DG. (1986).** *Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholin and thrombin in primates.* Circ. Res. Vol., 58: No 6
- Fressinaud E., Meyer D. (1991).** *Von Willebrand factor and platlet interactions with the vessel wall.* Blood Coagul. Fibrinolysis, 2 (2): 333-340
- Fukuhara M., Geary RL., Diz DI., Gallagher PE., Wilson JA., Glazier SS., Dean RH., Ferrario CM. (2000).** *Angiotensin-converting enzyme expression in human carotic artery atherosclerosis.* Hypertension, 35: 353-359
- Furchgott RF., Zawadzki JV. (1980).** *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* Nature, 288: 373-376
- Fuster V., Badimon L., Badimon JJ., Chesbro JH. (1992).** *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes.* N. Engl. J. Med., 326: 242-250, 310-318
- Galatius S., Wroblewski H., Vibeke BS., Bie P., Parving HH., Kastrup J. (1998).** *Endothelin and von Willebrand factor as parameters of endothelial function in idiopathic dilated cardiomyopathy: different stimuli for release before and after heart transplantation.* Am. Heart J., 137 (3): 549-554

- Geisterfer AT., Peach MJ., Owens GK. (1988).** *Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia of cultured rat aortic smooth muscle cells.* Circ. Res., 62: 749-756
- Gibbons GH. (1997).** *Vasculoprotective and cardioprotective mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibition: the homeostatic balance between angiotensin II and nitric oxide.* Clin.Cardiol., 20(11 Suppl.2): II-18-25
- Gibbs CR., Blann AD., Watson RD., Lip GY. (2001).** *Abnormalities of hemorheological, endothelial, and platelet function in patients with chronic heart failure in sinus rhythm: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and beta blocker therapy.* Circulation, 103 (13): 1746-51
- Griffin SA., Brown WCB., Mac Pherson F. (1991).** *Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a nonpressor mechanism.* Hypertension, 17: 626-635
- Grossman E., Ironi AN., Messerli FH. (1998).** *Comparative tolerability profile of hypertensive crisis treatments.* Drug Saf., 19 (2): 99-122
- Hamer RJ., Houdijk WP., Sixma JJ. (1986).** *The physiology and pathophysiology of the factor VIII complex.* Crit. Rev. Oncol. Hematol., 6 (1): 19-54
- Hamon M., Vallet B., Bauters C., Wernet N., McFadden EP., Lablanche JM., Dupuis B., Bertrand ME. (1994).** *Long-term oral administration of L-arginine reduces intimal thickening and enhances neoendothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation after arterial injury.* Circulation, 90: 1357-1362
- Hansson GK. (1993).** *Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis.* Br. Heart J., 69(Suppl): 38-41
- Hayashi H., Fukuto JM., Ignarro LJ., Chaudhuri G. (1992).** *Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female than in male rabbits: Implications for atherosclerosis.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 11259-11263

- Haynes WG., Webb DJ. (1994).** *Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone.* Lancet, 344: 852-854
- Heineke JW., Baker L., Rosen H. (1986).** *Superoxide mediated modification of low density lipoproteine by human arterial smooth muscle cells in culture.* Clin. Invest., 77: 757-761
- Heinle H., Kling D., Lindner V. (1987).** *Increased contractile responses of isolated arteriosclerotic rabbit carotid arteries to various vasoactive stimuli.* Int. Angiol., 6 (1): 53-58
- Heinzl S. (2000).** *Vasopeptidase-Hemmer. Omapatrilat bei Hypertonie und Herzinsuffizienz.* Med. Monatsschr. Pharm., 23(2): 38-41
- Hernandez A., Barberi L., Ballerio R., Testini A., Ferioli R., Bolla M., Natali M., Folco G., Catapano AL. (1998).** *Delapril slows the progression of atherosclerosis and maintains endothelial function in cholesterol-fed rabbits.* Atherosclerosis, 137: 71-76
- Hilleman DE. (2000).** *Role of angiotensin-converting-enzyme inhibitors in the treatment of hypertension.* Am. J. Health Syst. Pharm., 57 Suppl 1: 8-11
- Ignatowski AC. (1908).** *Influence of animal food on the organism of rabbits.* Imp. Voenno.-Med. Akad., 16, 154-173
- Ikram H., Mc Clean DR., Rousseau MF., Fleck E., Juilliere Y., Gronda E., Bryson C., Hanyok J. (1999).** *Omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor, produces long-term beneficial haemodynamic and neurohormonal effects in heart failure.* Eur. Heart J., 20 (Suppl. 76), 256
- Illiano S., Mombouli JV., Nagao T., Vanhoutte PM. (1994).** *Potentiation by Trandolaprilat of the endothelium-dependent hyperpolarization induced by bradykinin.* J. of Cardiovasc. Pharmacol., 23 (Suppl. 4), 6-10
- Jayakody RL., Kappagoda CT., Thompson ABR., Kappagoda CT. (1985).** *Cholesterol feeding impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta.* Can. J. Physiol. Pharmacol., 63, 1206-1209

- Jayakody RL., Kappagoda CT., Manohara PJ., Thompson S.&A. (1988).** *Impairment of endothelium-dependent relaxation: an early marker for atherosclerosis in the rabbit.* Br. J. Pharmacol., 94, 335-346
- Jessup W. (1996).** *Oxidized lipoproteins and nitric oxide.* Curr. Opin. in Lipidol., 7: 274-280
- Jokinen MP., Clarkson TB., Prichard RW. (1985).** *Animal models in atherosclerosis.* Exp. Mol. Pathol., 42(1): 1-28
- Jung O., Jung W., Malinski T., Wiemer G., Schoelkens BA., Linz W. (2000).** *Ischemic preconditioning and infarct mass: the effect of hypercholesterolemia and endothelial dysfunction.* Clin. Exp. Hypertension, 22(2): 165-79
- Kerr S., Brosnan J., McIntyre M., Reid JL., Dominiczak AF., Hamilton CA. (1999).** *Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension.* Hypertension 33: 1353-1358
- Kjøller-Hansen L., Steffensen R., Grande P. (2000).** *The angiotensin-converting enzyme inhibition post revascularization study (APRES).* J. Am. Col. Cardiol., 35: 881-888
- Krebs HA., Henseleit K. (1932).** *Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper.* Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., 210: 33-41
- Kritchevsky D., Tepper SA., Kim HK., Story JA., Vesselinovitch D., Wissler RW. (1976).** *Experimental atherosclerosis in rabbits fed cholesterol-free diets. Comparison of peanut, corn, butter and coconut oil.* Exp. Mol. Pathol., 24(3): 375-391
- Kroon PA., Thompson; Chao Y. (1985).** *Beta-very low density lipoproteins in cholesterol-fed rabbits are of hepatic origin.* Atherosclerosis, 56(3): 323-329
- Kugiyama K., Sugiyama S., Matsumura T., Ohta Y., Doi H., Yasue H. (1996).** *Suppression of atherosclerotic changes in cholesterol-fed rabbits treated with an oral inhibitor of neutral endopeptidase.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16(8): 1080-7

- Laufs U., Fata VL., Plutzky J., Liao JK. (1998).** *Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors.* Circulation, 97: 1129-1135
- Lehmann M., Durr H., Arratibel-Imaz I., Balle C., Keller E., Merkelbach H., Keul J. (1989).** *Plasma catecholamine and cardiovascular responses to nifedipine in hypertensives WHO-stage II.* Arzneimittelforschung, 39 (12): 1593-1596
- Lerman A., Edwards BS., Hallett JW., Heublein DM., Sandberg SM., Burnett JC. (1991).** *Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis.* N. Engl. J. Med., 325 (14): 997-1001
- Lerman A., Holmes DR., Bell MR., Garrat KN., Nishimura RA., Burnett JC. (1995).** *Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans.* Circulation, 92 (9): 2426-31
- Levin ER., Gardner DG., Samson WK. (1998).** *Natriuretic peptides.* N. Engl. J. Med., 339: 321-328
- Linz W., Wiemer G., Gohlke P., Unger T., Schölkens BA. (1995).** *Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors.* Pharmacol. Reviews, Vol. 47, No.1: 25-49
- Lip GY., Blann A. (1997).** *Von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders.* Cardiovasc. Res., 34 (2): 255-265
- Lonn EM., Yusuf S., Dzavik V., Doris C., Yi Q., Smith S., Moore-Cox A., Bosch J., Riley W., Teo K. (2001).** *Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE).* Circulation, 103(7): 919-925
- Lüscher T., Vanhoutte PM. (1990).** *The endothelium: Modulator of cardiovascular function.* Boca Raton, CRC 1990
- Lusis AJ. (2000).** *Atherosclerosis.* Nature, 407: 233-241

- Mancini GBJ., Henry GC., Macaya C., O'Neill BJ., Pucillo AL., Carere RG., Wargovich TJ., Mudra H., Luscher TF., Klibaner MI., Haber HE., Uprichard AC., Pepine CJ., Pitt B. (1996).** *Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease.* Circulation, 97: 258-265
- Mathew V., Hasdai D., Lerman A. (1996).** *The role of endothelin in coronary atherosclerosis.* Mayo Clin. Proc., 71 (8): 769-777
- Mitchell GF., Block AJ., Hartley LH., Tardiff JC., Rouleau JL., Pfeffer MA. (1999).** *The vasopeptidase inhibitor omapatrilat has a favorable pressure-independent effect on conduit vessel stiffness in patients with congestive heart failures.* Circulation, 100 (Suppl. 1): I-646
- Moncada S., Higgs EA. (1991).** *Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance.* Eur. J. Clin. Invest., 21: 361-74
- Moorodian, DL., Hutsell TC., Keefer LK. (1995).** *Nitric oxide (NO) donor molecules: Effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro.* J. Cardiovasc. Pharmacol., 25: 674-678
- Morawietz H., Rueckschloss U., Niemann B., Duerrschmidt N., Galle J., Hakim K., Zerkowski HR., Sawamura T., Holtz J.(1999).** *Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein.* Circulation, 100: 899-902
- Mügge A., Brandes RP., Böger RH., Dwenger A., Bode-Böger S., Kienke S., Fröhlich JC. (1994).** *Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits.* J. Cardiovasc. Pharmacol., 24: 994-998
- Münzel T., Sayegh H., Freeman BA., Tarpey MM., Harrison DG. (1995).** *Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance.* J. Clin. Invest., 95(1): 187

- Munoz CM., Coteccia S., Leeb-Lundberg LM. (1993).** *B₂ kinin receptor-mediated internalization of bradykinin in DDT1 MF-2 smooth muscle cells is paralleled by sequestration of the occupied receptors.* Arch. Biochem. Biophys., 301: 336-344
- Naftilan AJ., Zuo WM., Ingelfinger JR., Ryan T., Pratt T., Dzau VJ. (1991).** *Localization and differential regulation of angiotensinogen mRNA expression in the vessel wall.* J. Clin. Invest., 87: 1300-1311
- Nathisuwan S., Talbert RL. (2002).** *A review of vasopeptidase inhibitors: a new modality in the treatment of hypertension and chronic heart failure.* Pharmacotherapy, 22 (1): 27-42
- Nickenig G., Jung O., Strehlow K., Zolk O., Linz W., Schölkens BA., Böhm M. (1997).** *Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT₁-receptor expression.* Am. J. Physiol., 272: H2701-H2707
- Norton GR., Woodiwiss AJ., Hartford C., Trifunovic B., Middlemost S., Lee A., Allen MJ. (1999).** *Sustained antihypertensive actions of a dual angiotensin-converting-enzyme neutral endopeptidase inhibitor, omapatrilat, in black hypertensive subjects.* Am. J. Hypertension, 12 (6): 563-571
- Ohara Y., Peterson YE., Harrison DG. (1993).** *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production.* J. Clin. Invest., 91: 2546-2551
- Packer et al. (2002).** Presented at the American College of Cardiology 51st Annual Scientific Session.
- Pfister SL., Campbell WB. (1996).** *Contribution of arachidonic acid metabolites to reduced norepinephrine-induced contractions in hypercholesterolemic rabbit aortas.* J. Cardiovasc. Pharmacol., 28 (6): 784-791
- Plouin PF., Mancina G., Cobbe SM. (2000).** *Omapatrilat in persons with enhanced risk of atherosclerotic events: the OPERA trial.* Hypertension, 18: 95

- Potter DD., Sobey CG., Tompkins PK., Rossen JD., Heistad DD. (1998).** *Evidence that macrophagen in atherosclerotic lesions contain angiotensin II.* Circulation, 98: 800-807
- Quaschnig T., d'Uscio LV., Lüscher TF. (1999).** *The dual metalloprotease inhibitor omapatrilat exhibits greater endothelial protection compared to the ACE-inhibitor captopril in salt induced hypertension.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 275: 745-752
- Radomski MW., Palmer RMJ., Moncada S. (1991).** *Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway.* Trends Pharmacol. Sci., 12: 87-88
- Rekhter MD., Gordon D. (1994).** *Does platelet-derived growth factor-A chain stimulate proliferation of arterial mesenchymal cells in human atherosclerotic plaque?* Circ. Res., 75: 410-417
- Riezebos J., Vleeming W., Beems RB., van Amsterdam JGC., Meijer GW., de Wildt DJ., Porsius AJ., Wemer J. (1994).** *Comparison of the antiatherogenic effects of Isradipine and Ramipril in cholesterol-fed rabbits: I.Effects on progression of atherosclerosis and endothelial dysfunction.* J. of Cardiovas. Pharmacol., 23 (3): 415-423
- Rogerson FM., Chai SY., Schlawe I., Murray KW., Marley PD., Mendelsohn FAO. (1992).** *Presence of angiotensin converting enzyme in the adventitia of large blood vessels.* J. Hypertens., 10: 615-620
- Rolland PH., Chapiot P., Friggi A., Piquet P., Barlatier A., Scalbert E., Bodard H., Tranier P., Mercier C., Luccioni R., Garcon D. (1993).** *Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition with perindolol on hemodynamics, arterial structure, and wall rheology in the hindquarters of atherosclerotic mini-pigs.* Am. J. Cardiol., 71: 22E-27E
- Rosen CM., Freeman BA. (1984).** *Detection of superoxide generated by endothelial cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 7269-7273
- Ross R. (1986).** *The pathogenesis of atherosclerosis- an update.* N. Engl. J. Med., 314: 488-500

- Ross R. (1992).** *The pathogenesis of atherosclerosis.*
The heart disease, a textbook of cardiovascular medicine.
- Ross R. (1993).** *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.*
Nature, 362: 488-500
- Rouleau JL., Pfeffer MA., Stewart DJ., Kerut EK., Porter CB., Parker JO., Smith LK., Proulx G., Qian C., Block AJ. (1999).** *Vasopeptidase inhibitor or angiotensin converting enzyme inhibitor in heart failure? Results of the IMPRESS trial.* Circulation, 100 (Suppl. 1): I-782
- Schachinger V., Zeiher AM. (2000).** *Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction.* Z.-Kardiol., 89 Suppl 9IX: 70-74
- Seymour AA., Abboa-Offei BE., Smith PL., Mathers PD., Asaad MM., Rogers WL. (1995).** *Potentialiation of natriuretic peptides by neutral endopeptidase inhibitors.* Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 22: 63-69
- Skidgel RA. (1992).** *Bradykinin-degrading enzymes: structure, function, distribution and potential roles in cardiovascular pharmacology.*
J. Cardiovasc. Pharmacol., 20 (Suppl 9): 4-9
- Spieker LE, Mitrovic V., Noll G., Pacher R., Schulze MR., Muntwyler J., Schalcher C., Kiowski W., Lüscher T. (2000).** *Acute hemodynamic and neurohumoral effects of selective ET(a) receptor blockade in patients with congestive heart failure.* J. Am. Col. Cardiol., Vol 35, No.7: 1745-1752
- Sтары HC. (1989).** *Evolution and progression of atherosclerotic lesion in coronary arteries of children and young adults.* Atherosclerosis, 9 (Suppl.1): 19-32
- Sтары HC. (1992).** *Composition and classification of human atherosclerotic lesions.* Virchows Archiv, (A)421: 277-290
- Sтары HC., Chandler AB., Glagov S., Guyton JR., Insull W., Rosenfeld ME., Schaffer SA., Schwartz CJ., Wagner WD., Wissler RW. (1994).**
A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis, American Heart Association.
Arteriosclerosis Thromb., 14 : 840-856

Statistisches Bundesamt (1999), Wiesbaden.

Stein BC., Levin RI. (1998). *Natriuretic peptides. Physiology, therapeutic potential, and risk stratification in ischemic heart disease.*

Am. Heart J., 135: 914-923

Steinberg D. (1983). *Lipoproteins and atherosclerosis. A look back and a look ahead.* Arteriosclerosis, 3: 283

Steinberg D., Parthasarathy S., Carew TE., Khoo JC., Witztum JL. (1989). *Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.* N. Engl. J., 320: 915-924

Stroes E., Hijmering M., van Zandvoort M., Wever R., Rabelink TJ., van Faassen EE. (1998). *Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase.* FEBS Lett., 438: 161-164

The Heart Outcome Prevention Evaluation Study Investigators. (2000). *Effects of angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients.* N. Engl. J. Med., 342: 145-153

The OCTAVE study group. (2002). Presented at the American College of Cardiology 51st Annual Scientific Session.

Thomas CV., Mc Daniel GM., Holzgrefe HH., Mukherjee R., Hird RB., Walker JD., Hebbar L., Powel JR. (1998). *Chronic dual inhibition of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase during the development of left ventricular dysfunction in dogs.* J. Cardiovasc. Pharmacol., 32: 902-912

Thyberg J., Hedin U., Sjölund M., Palmberg L., Bottger BA. (1990). *Regulation of differential properties and proliferation of arterial smooth muscle cells.* Arteriosclerosis, 10: 966-990

Trippodo NC., Robl JA., Assad MM., Fox M., Giancarli MR., Cheung HS. (1995). *Cardiovascular effects of the novel dual inhibitor of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme BMS-182657 in experimental hypertension and heart failure.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 275: 745-752

- Trippodo NC., Panchal BC., Fox M. (1995).** *Repression of angiotensin II and potentiation of bradykinin contribute to the synergistic effects of dual metalloprotease inhibition in heart failure.*
J. Pharmacol. Exp. Ther., 272: 619-627
- Vane JR., Anggard EE., Botting RM. (1990).** *Regulatory functions of the vascular endothelium.* N. Engl. J. Med., 323(1): 27-36
- Vargas HM., Cuevas JM., Ignarro LJ., Chaudhuri G. (1991).** *Comparison of the inhibitory potencies of NG-methyl-, NG-nitro- and NG-amino-L-arginine on EDRF function in the rat: evidence for continuous basal EDRF release.*
J. Pharmacol. Exp. Ther., 257: 1208-1215
- Verbeuren TJ., Jordaens FH., van Hove CE., Coene MC., Herman AG. (1986).** *Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits.*
Circ. Res., 58 (4): 552-64
- Verbeuren TJ., Jordaens FH., van Hove CE., van Hoydonck AE., Herman AG. (1990).** *Release and vascular activity of endothelium-derived relaxing factor in atherosclerotic rabbit aorta.* Europ. J. of Pharmacol., 191: 173-184
- Wang W., Wang S., Yan L., Madara P., Del-Pilar-Cintron A., Wesley RA., Danner RL. (2000).** *Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase.*
J. Biol. Chem., 275 (22): 16899-16903
- Watanabe Y. (1980).** *Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit).* Atherosclerosis, 36: 261-268
- Wegner M., Hirth-Dietrich C., Knorr A., Dressel J., Ganten D., Stasch JP. (1996).** *Cardiorenal consequences of dual angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase 24.11 inhibition in transgenic rats with an extra renin gene.* Hypertens. Res., 19 (3): 151-159
- White CR., Darley-Usmar V., Berrington WR., Mc Adams M., Gore JZ., Thompson JA., Parks DA., Tarpey MM., Freeman BA. (1996).** *Circulating plasma xanthin oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits.* PNAS., 93: 8745-9749

- Wiemer G., Pierchala B., Mesaros S., Schölkens BA., Malinski T. (1996).** *Direct measurement of nitric oxide release from cultured endothelial cells stimulated by bradykinin or ramiprilat.* Endothelium, 4: 119-125
- Wiemer G., Itter G., Malinski T., Linz W. (2001).** *Decreased nitric oxide availability in normotensive and hypertensive rats with failing hearts after myocardial infarction.* Hypertension, 38: 1367-1371
- Wilson SK., Lynch DR., Snyder SH. (1987).** *Angiotensin converting enzyme labelled with (3H)captopril. Tissue localization and changes in different models of hypertension in the rat.* J. Clin. Invest., 80: 841-851
- Wissler RW. (1992).** *Theories and new horizons in the pathogenesis of atherosclerotics and the mechanisms of clinical effects.* Arch. Pathol. Lab. Med., 116: 1281-1291
- Witztum JL. (1994).** *The oxidation hypothesis of atherosclerosis.* Lancet, 344: 793-795
- World Health Organization Technical Report Series (1958).** *The classification of atherosclerotic lesions. Report of a study group.* WHO Tech Rep. Ser., 143: 1-20
- Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T. (1988).** *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.* Nature, 332: 411-415
- Ylä-Herttuala S., Rosenfeld ME., Parathasarathy S., Sigal E., Särkiojy T., Witztum J., Steinberg D. (1991).** *Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions. 15-Lipoxygenase and acetyl low-density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts.* J. Clin. Invest., 87: 1146-1152
- Yusuf S. (2001).** *Clinical, public health, and research implications of the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study.* Eur. Heart J., 22: 103-104

VIII Danksagung

Die Arbeit wurde in der Zeit vom September 2000 bis Juni 2002 bei der Aventis Pharma Deutschland GmbH in Frankfurt angefertigt.

Allen sei herzlich gedankt, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

- Herrn ***PD Dr. Wolfgang Linz*** für die Überlassung des Themas, die unermüdliche Beantwortung aller Fachfragen und die intensive und freundliche Betreuung bei der Versuchsdurchführung und der Erstellung dieser Dissertation.
- Herrn Prof. Dr. Andreas Busch (Leiter der Indikationsgruppe Herz-Kreislauf-Erkrankungen) für die Ermöglichung dieser Arbeit in den Einrichtungen der Firma Aventis Pharma Deutschland GmbH.
- Herrn Prof. Dr. E. Petzinger (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) für die freundliche Betreuung und für die Begutachtung dieser Dissertation.

- Allen Mitarbeitern des Labors von Herrn PD Dr. Linz, insbesondere Corinna Bartsch, Melanie Behnke, Petra Fritz und Silke Weber.
- Herrn Dr. Martin Gerl (Aventis Pharma Deutschland GmbH) und seinen Mitarbeitern für die Durchführung der Blutanalysen.
- Herrn Prof. Dr. Tadeusz Malinski (Oakland University, Michigan, USA) und seinen Mitarbeitern für die Messung der Stickstoffmonoxid- und Superoxidfreisetzung.
- Herrn Rainer Uhl (Statistische Abteilung, Convidence GmbH, Eschborn am Taunus) für die wertvolle Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten.
- ***Meinen Eltern***, die mich während des ganzen Studiums und der Promotion in jeder Hinsicht unterstützt haben.
- ***Meinem Freund Uwe***, der mich ebenso liebevoll unterstützt hat.